

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 100 31 932 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 100 31 932.7
㉔ Anmeldetag: 30. 6. 2000
㉕ Offenlegungstag: 10. 1. 2002

㉙ Int. Cl.⁷:
C 12 N 9/14
C 12 N 15/63
C 12 N 1/21
C 07 H 21/00
A 61 K 38/17
C 07 K 14/435
C 07 K 16/00
A 61 K 39/395

DE 100 31 932 A 1

㉙ Anmelder:
BASF AG, 67063 Ludwigshafen, DE

㉚ Vertreter:
Reitstötter, Kinzebach & Partner, 81679 München

㉛ Erfinder:
Erfinder wird später genannt werden

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

㉜ Calpain-Protease 12

㉝ Calpain-Protease 12 (Capn12), dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Aminosäuresequenz, umfassend die Aminosäuren 1-342 der SEQ ID NO: 1 oder eine Aminosäuresequenz ausgewählt unter SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 4 aufweist; sowie deren funktionale Analoge; dafür kodierende Nukleinsäuren; rekombinante Vektoren, welche diese kodierenden Sequenzen enthalten; damit transfizierte Mikroorganismen; Verfahren zur rekombinanten Herstellung der Capn12; und verschiedene Anwendungen der Capn12 und dafür kodierender Nukleinsäuren.

DE 100 31 932 A 1

[0001] Die Erfindung betrifft eine neue Calpain-Protease mit der Bezeichnung Calpain-Protease 12 und funktionale Analoge davon (im Folgenden bezeichnet als Capn12); dafür kodierende Nukleinsäuren; rekombinante Vektoren, welche diese kodierenden Sequenzen enthalten; damit transfigierte Mikroorganismen; Verfahren zur rekombinanten Herstellung der Capn12; sowie verschiedene Anwendungen der Capn12 und dafür kodierender Nukleinsäuren.

[0002] Calpaine sind eine Familie cytosolischer Cystein-Proteasen. Die klassischen Calpaine bestehen aus einer isoformspezifischen großen Untereinheit (80 kDa) und einer unveränderlichen kleinen Untereinheit (30 kDa), die Capn4 genannt wird. Die große Untereinheit klassischer Calpaine weist eine Vier-Domänen-Struktur auf, umfassend eine Domäne mit Proteaseaktivität und eine C-terminale, Calmodulin-ähnliche Domäne, die Calcium binden kann. Man fand jedoch kürzlich mehrere atypische Säugetierhomologe der großen Calpain-Untereinheit, denen die Kennzeichen eines aktiven Zentrums einer Protease fehlen (Capn6; Dear et al., 1997) und/oder die eine alternative C-terminale Domäne aufweisen, die möglicherweise kein Calcium bindet (Capn5, Capn6, Capn7, Capn8; Dear et al., 1997; Braun et al., 1999; Franz et al., 1999). Eine Zusammenfassung der gegenwärtig bekannten Mitglieder der Genfamilie der Säugetier-Calpaine ist im Internet erhältlich (<http://Ag.Arizona.Edu/calpains>).

[0003] Die physiologische Rolle der Calpaine ist unklar. Calpaine spalten zahlreiche Substrate (Carafoli und Molinari, 1998) und wurden mit einer Vielzahl von Prozessen in Zusammenhang gebracht, einschließlich Apoptose (Wang, 2000), Zellteilung (Mellgren, 1997), Modulation der Interaktionen des Integrin-Cytoskeletts (Schoenwaelder et al., 1997) und synaptische Plastizität (Chan und Mattson, 1999). Sie wurden außerdem mit zahlreichen pathologischen Krankheitszuständen in Verbindung gebracht, wie Alzheimer, Katarakt, Demyelinisierung, kardiale Ischämie, Entzündung und traumatische Hirnverletzung (Übersichtsartikel: Carafoli und Molinari, 1998; Sorimachi et al., 1997; Wang und Yuen, 1997). Mutationen im Capn3-Gen sind für die Beckengürtel-Muskeldystrophie Typ 2A verantwortlich (Richard et al., 1995).

[0004] Aufgrund der vielfältigen physiologischen und pathologischen Funktionen der Calpaine, stellte sich die Aufgabe, neue Homologe der Gen-Familie der großen Calpain-Untereinheit bereitzustellen. Damit ließen sich beispielsweise neue Wirkstoffe bzw. neue Wirkstofftargets finden oder entwickeln, die bei der Diagnose, Therapie und/oder Prophylaxe von Krankheitszuständen einsetzbar sind, in die Calpaine und deren Substrate oder auf diese wirkende Stoffe involviert sind. Diese Aufgabe wurde überraschenderweise durch die Bereitstellung einer neuen Calpain-Protease, der Calpain-Protease 12 (Capn12) und funktionalen Äquivalenten davon, gelöst.

[0005] Die Capn12 ist dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Aminosäuresequenz, umfassend die Aminosäuren 1-342 der SEQ ID NO: 1 aufweist. Gegenstand der Erfindung sind auch funktionale Äquivalente dieser Teilsequenz.

[0006] Bevorzugte Varianten davon sind dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Aminosäuresequenz ausgewählt unter SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 4 aufweisen. SEQ ID NO: 1 steht für die Aminosäuresequenz der Splice-Variante Capn12A, SEQ ID NO: 2 für die Aminosäuresequenz der Splice-Variante Capn12B, SEQ ID NO: 3 für die Aminosäuresequenz der Splice-Variante Capn12C und SEQ ID NO: 4 für die Aminosäuresequenz der Capn12 aus Klon 914413 der Maus-EST-Datenbank. Dabei sind die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 1 bis 4 im N-terminalen Abschnitt der Aminosäuren 1-342 zueinander identisch. Das vorhergesagte Protein entsprechend der Splice-Variante Capn12A weist 720 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 80,5 kDa auf.

[0007] Gegenstand der Erfindung sind auch die funktionalen Äquivalente der Capn12 bzw. der konkret offenbarten Aminosäuresequenzen. Funktionale Äquivalente umfassen Aminosäuresequenzen, die sich von den konkreten Sequenzen ableiten lassen und in denen im Vergleich dazu eine oder mehrere Aminosäuren substituiert, deletiert, invertiert oder addiert sind, ohne dass die Cystein-Protease-Aktivität und/oder wenigstens ein weiteres Charakteristikum der Capn12 im Wesentlichen beeinflusst werden. Weitere Capn12-Charakteristika werden in späteren Abschnitten beschrieben. Erfindungsgemäß umfasst sind auch Capn12-charakteristische Teilsequenzen oder Fragmente der Capn12, die beispielsweise durch proteolytischen Verdau, Peptidsynthese oder rekombinante DNA-Technik hergestellt werden können. Diese können beispielsweise zur Herstellung monoklonaler oder polyklonaler Antikörper verwendet werden.

[0008] Die konkret offenbarten Aminosäuresequenzen repräsentieren Aminosäuresequenzen von Splice-Varianten der Capn12, die aus einer Maus-EST-Datenbank bestimmt wurden. Gegenstand der Erfindung sind jedoch auch alle Capn12-Homologe eukaryontischer Spezies, d. h. der Evertebraten und Vertebraten, insbesondere der Säugetiere, z. B. Ratte, Katze, Hund, Schwein, Schaf, Rind, Pferd, Affe und besonders bevorzugt Mensch und weitere natürlich vorkommende Varianten. Erfindungsgemäß umfasst sind auch alle entwicklungs- und organ- bzw. gewebespezifisch exprimierte Capn12-Formen und künstlich erzeugte Homologe, die die vorgegebenen strukturellen und/oder funktionalen Eigenschaften aufweisen.

[0009] Die erfindungsgemäße Capn12 ist insbesondere dadurch gekennzeichnet, dass sie Cystein-Protease-Aktivität aufweist. Sie weist in ihrer Aminosäuresequenz die Aminosäuren Cys, His und Asn auf (in den Splice-Varianten Capn12A, B und C: Cys105, His259 und Asn283), die für das aktive Zentrum von Cystein-Proteasen charakteristisch und für dessen Funktion wesentlich sind. Die Splice-Variante Capn12A weist darüber hinaus eine ausgeprägt saure Region und eine Calmodulin-ähnliche, vermutlich Ca^{2+} -bindende Region auf.

[0010] Die erfindungsgemäße Capn12 ist außerdem dadurch gekennzeichnet, dass das sie kodierende Gen der Maus auf dem Chromosom 7 zwischen den Markern D7Mit72 (10,4 cM) und D7Mit267 (11,0 cM) lokalisiert ist.

[0011] Die erfindungsgemäße Capn12 ist außerdem dadurch gekennzeichnet, dass sie, z. B. in der Maus, im Cortex des Haarfollikels der Haut exprimiert wird.

[0012] Weiterhin ist die erfindungsgemäße Capn12 dadurch gekennzeichnet, dass sie in der Anagenphase des Haarzyklus exprimiert wird.

[0013] Gegenstand der Erfindung sind auch Calpain-Proteine, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie wenigstens eine erfindungsgemäße Capn12 aufweisen. Vorzugsweise weist ein solches Calpain-Protein neben der Capn12 als große Untereinheit noch eine Capn4 als kleine Protein-Untereinheit auf. Darüber hinaus können noch weitere Protein-Untereinheiten, wie beispielsweise regulatorische Untereinheiten oder Untereinheiten, die die Lokalisation des Proteins in definierten Zellkompartimenten vermitteln, enthalten sein.

[0014] Weiterhin umfasst die Erfindung auch Polynukleotide, die für eine erfindungsgemäße Capn12 kodieren, sowie deren funktionale Äquivalente und damit hybridisierbare oder dazu komplementäre Polynukleotide, umfassend einzel- und doppelsträngige DNA- und RNA-Sequenzen. Diese Polynukleotide lassen sich bei Durchmusterung von genomischen oder cDNA-Bibliotheken auffinden und gegebenenfalls daraus mit geeigneten Primern mittels PCR vermehren und anschließend beispielsweise mit geeigneten Sonden isolieren. Eine weitere Möglichkeit bietet die Transformation geeigneter Mikroorganismen mit erfindungsgemäßen Polynukleotiden oder Vektoren, die Vermehrung der Mikroorganismen und damit der Polynukleotide und deren anschließende Isolierung. Darüber hinaus können erfindungsgemäße Polynukleotide auch auf chemischem Wege synthetisiert werden.

[0015] Gegenstand der Erfindung sind auch Polynukleotide mit einer Nukleinsäuresequenz, ausgewählt unter SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 oder SEQ ID NO: 8. SEQ ID NO: 5 steht für die Nukleinsäuresequenz der cDNA der Splice-Variante Capn12A, SEQ ID NO: 6 für die Nukleinsäuresequenz der cDNA der Capn12B, SEQ ID NO: 7 für die Nukleinsäuresequenz der cDNA der Capn12C und SEQ ID NO: 8 für die genomische Nukleinsäuresequenz der Capn12 der Maus, umfassend alle Exon- und Intron-Sequenzen. Die vorhergesagte genomische Sequenz der Capn12 der Maus umfasst 21 Exons und einen genomischen Abschnitt von 13116 Basenpaaren.

[0016] Funktionale Äquivalente erfindungsgemäßer Polynukleotide umfassen durch Degeneration des genetischen Codes abgeleitete Sequenzen und damit stumme Nukleotidsubstitutionen (d. h. ohne Veränderungen der resultierenden Aminosäuresequenz) und konservative Nukleotidsubstitutionen (d. h. die betreffende Aminosäure wird durch eine Aminosäure gleicher Ladung, Größe, Polarität und/oder Löslichkeit ersetzt). Funktionale Äquivalente erfindungsgemäßer Polynukleotide weisen somit eine durch Nukleotidsubstitution, -deletion, -inversion oder -addition veränderte Sequenz auf, kodieren jedoch ebenfalls für eine funktional äquivalente Capn12, wie z. B. mit gleicher oder vergleichbarer Cystein-Protease-Aktivität. Insbesondere umfassen erfindungsgemäß geeignete Polynukleotide wenigstens eine der Teilsequenzen, welche für charakteristische Aminosäuresequenzen der Capn12 kodieren.

[0017] Gegenstand der Erfindung sind auch die Primersequenzen SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 und SEQ ID NO: 18, die an erfindungsgemäße Polynukleotide hybridisieren können bzw. komplementär dazu sind und beispielsweise zu deren Amplifikation durch RT-PCR oder PCR eingesetzt werden können.

[0018] Unter der Eigenschaft, an Polynukleotide hybridisieren zu können, versteht man die Fähigkeit eines Poly- oder Oligonukleotids unter stringenten Bedingungen an eine nahezu komplementäre Sequenz zu binden, während unter diesen Bedingungen unspezifische Bindungen zwischen nicht-komplementären Partnern unterbleiben. Dazu müssen die Sequenzen zu 70–100%, vorzugsweise zu 90–100%, komplementär sein. Die Eigenschaft komplementärer Sequenzen, spezifisch aneinander binden zu können, macht man sich beispielsweise in der Northern- oder Southern-Blot-Technik oder bei der Primerbindung in PCR oder RT-PCR zunutze. Üblicherweise werden dazu Oligonukleotide ab einer Länge von 30 Basenpaaren eingesetzt. Unter stringenten Bedingungen versteht man beispielsweise in der Northern-Blot-Technik die Verwendung einer 50–70°C, vorzugsweise 60–65°C warmen Waschlösung, beispielsweise 0,1x SSC-Puffer mit 0,1% SDS (20x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7,0) zur Elution unspezifisch hybridisierter cDNA-Sonden oder Oligonukleotide. Dabei bleiben, wie oben erwähnt, nur in hohem Maße komplementäre Nukleinsäuren aneinander gebunden.

[0019] Gegenstand der Erfindung sind auch Expressionskassetten, die wenigstens ein erfindungsgemäßes Polynukleotid umfassen, das mit wenigstens einer regulatorischen Nukleinsäuresequenz operativ verknüpft ist. Vorzugsweise liegt 5'-strangaufwärts vom erfindungsgemäßen Polynukleotid eine Promotorsequenz und ermöglicht auf diese Weise eine kontrollierte Expression der Capn12. Besonders bevorzugt liegen 3'-strangabwärts vom erfindungsgemäßen Polynukleotid eine Terminatorsequenz sowie gegebenenfalls weitere übliche regulatorische Elemente, und zwar jeweils operativ verknüpft mit der die Capn12 kodierenden Sequenz.

[0020] Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequentielle Anordnung regulatorischer und kodierender Sequenzen, wie z. B. von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und gegebenenfalls weiterer regulatorischer Elemente derart, sodass jedes der regulatorischen Elemente seine Funktion vor, während oder nach Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Beispiele für weitere operativ verknüpfbare Sequenzen sind Targeting-Sequenzen, Translationsverstärker, Enhancer, Polyadenylierungssignale und dergleichen. Brauchbare regulatorische Elemente umfassen auch selektierbare Marker, Amplifikationssignale, Replikationsursprünge und dergleichen.

[0021] Zusätzlich zu den artifiziellen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulationssequenz vor dem eigentlichen Strukturgen noch vorhanden sein. Durch genetische Veränderung kann diese natürliche Regulation gegebenenfalls ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht oder erniedrigt werden. Die Expressionskassette kann aber auch einfacher aufgebaut sein, d. h. es werden keine zusätzlichen Regulationssignale vor das Strukturgen inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wird nicht entfernt. Stattdessen kann beispielsweise die natürliche Regulationssequenz so mutiert werden, dass keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert oder verringert wird. Die Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien in der Expressionskassette enthalten sein.

[0022] Beispiele für brauchbare Promotoren sind: cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacIq-, '17-, '15-, '13-, gal-, trc-, ara-, SP6-, 1-PR- oder im 1-PL-Promotor, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden; sowie die gram-positiven Promotoren amy und SPO2, die Hefepromotoren ADC1, MFa, AC, P-60, CYC1, GAPDII oder die Pflanzenpromotoren CaMV/35S, SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, nos oder der Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor. Besonders bevorzugt ist die Verwendung induzierbarer Promotoren, wie z. B. licht- und insbesondere temperaturinduzierbarer Promotoren, wie der P_l-Promotor.

[0023] Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen verwendet werden. Darüber hinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

[0024] Die genannten regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Nukleinsäuresequenzen und die Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert oder überexprimiert wird. Die Expression kann durch diese regulatorischen Elemente auch gewebe-, zell- oder entwicklungsspezifisch erfolgen, wenn der Vektor in einen höheren Organismus, wie in ein Tier oder eine Pflanze, eingebracht wird.

[0025] Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Expression positiv beeinflussen und dadurch erhöhen oder erniedrigen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA erhöht wird. Unter "Enhancer" sind beispielsweise DNA-Sequenzen zu verstehen, die über eine verbesserte Wechselwirkung zwischen RNA-Polymerase und DNA eine erhöhte Expression bewirken.

[0026] Die Herstellung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einem geeigneten die Capn12 kodierenden Polynukleotid, sowie einem Terminator- oder Polyadenylierungssignal. Dazu verwendet man gängige Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie beispielsweise die Insertion über Restriktionsenzymstimmstellen, oder wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989), sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) beschrieben sind.

[0027] Gegenstand der Erfindung sind auch rekombinante Vektoren zur Transformation von eukaryontischen oder prokaryontischen Wirten, die ein erfindungsgemäßes Polynukleotid oder eine erfindungsgemäße Expressionskassette tragen. Diese Vektoren erlauben die Expression der Capn12 in einem geeigneten Wirtsorganismus. Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P.H. et al., Hrsg., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen werden. Unter Vektoren sind neben Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren, wie beispielsweise Phagen, Viren, wie SV40, CMV, Baculovirus und Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Plasmide, Cosmide, und lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus oder chromosomal repliziert werden.

[0028] Gegenstand der Erfindung sind auch Mikroorganismen, die einen erfindungsgemäßen Vektor enthalten oder solche, die die Capn12 endogen exprimieren. Diese können zur Produktion rekombinanter Capn12 eingesetzt werden. Vorteilhafterweise werden die oben beschriebenen erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionskassetten als Teil eines Expressionsvektors in ein geeignetes Wirtssystem eingebracht und exprimiert. Dabei werden vorzugsweise dem Fachmann bekannte geläufige Klonierungs- und Transfektionsmethoden verwendet, wie beispielsweise Co-Präzipitation, Protoplastenfusion, Elektroporation, retrovirale Transfektion und dergleichen, um die genannten Nukleinsäuren im jeweiligen Expressionssystem zur Expression zu bringen. Geeignete Systeme werden beispielsweise in *Current Protocols in Molecular Biology*, F. Ausubel et al., Hrsg., Wiley Interscience, New York 1997 und in J. Sambrook, E.F. Fritsch und T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, NY (1980), beschrieben.

[0029] Als Wirtsorganismen zur Transformation mit erfindungsgemäßen Vektoren sind prinzipiell alle Organismen geeignet, die eine Expression der erfindungsgemäßen Polynukleotide, ihrer Allelvarianten, ihrer funktionellen Äquivalente oder Derivate ermöglichen. Unter Wirtsorganismen sind beispielsweise Bakterien, Pilze, Hefen, pflanzliche oder tierische Zellen zu verstehen. Bevorzugte Organismen sind Bakterien, wie solche der Gattungen *Escherichia*, wie z. B. *Escherichia coli*, *Streptomyces*, *Bacillus* oder *Pseudomonas*, eukaryotische Mikroorganismen, insbesondere Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus*, höhere eukaryontische Zellen aus Tieren oder Pflanzen, beispielsweise Sf9 oder CHO-Zellen. Gewünschtenfalls kann das Genprodukt auch in transgenen Organismen wie transgenen Tieren, wie insbesondere Mäusen, Schafen oder transgenen Pflanzen zur Expression gebracht werden. Bei den transgenen Organismen kann es sich auch um sogenannte Knock-Out-Tiere oder -Pflanzen handeln, in denen das korrespondierende endogene Gen ausgeschaltet wurde, wie z. B. durch Mutation oder partielle oder vollständige Deletion.

[0030] Die Selektion erfolgreich transformierter Organismen kann durch Markergene erfolgen, die ebenfalls im Vektor oder in der Expressionskassette enthalten sind. Beispiele für solche Markergene sind Gene für Antibiotikaresistenz und für Enzyme, die eine farbgebende Reaktion katalysieren, die ein Anfärben der transformierten Zelle bewirkt. Diese können dann mittels automatischer Zellsortierung selektiert werden. Erfolgreich mit einem Vektor transformierte Mikroorganismen, die ein entsprechendes Antibiotikaresistenzgen (z. B. G418 oder Hygromycin) tragen, lassen sich durch entsprechende Antibiotika-enhaltende Medien oder Nährböden selektieren. Markerproteine, die an der Zelloberfläche präsentiert werden, können zur Selektion mittels Affinitätschromatographie genutzt werden.

[0031] Die Kombination aus den Wirtsorganismen und den zu den Organismen passenden Vektoren, wie Plasmide, Viren oder Phagen, wie beispielsweise Plasmide mit dem RNA-Polymerase/Promoter-System, die Phagen X, μ oder andere temperente Phagen oder Transposons und/ oder weiteren vorteilhaften regulatorischen Sequenzen bildet ein Expressionssystem. Beispielsweise ist unter dem Begriff "Expressionssystem" die Kombination aus Säugetierzellen, wie CHO-Zellen, und Vektoren, wie pcDNA3neo-Vektor, die für Säugetierzellen geeignet sind, zu verstehen.

[0032] Wie oben beschrieben, kann das Genprodukt vorteilhaft auch in transgenen Tieren, z. B. Mäusen, Schafen oder transgenen Pflanzen zur Expression gebracht werden. Ebenso ist es möglich, zellfreie Translationssysteme mit der von der Nukleinsäure abgeleiteten RNA zu programmieren.

[0033] Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Capn12, wobei man einen Capn12-produzierenden Mikroorganismus kultiviert, gegebenenfalls die Expression der Capn12 induziert und die Capn12 aus der Kultur isoliert. Die Capn12 kann so auch in großtechnischem Maßstab produziert werden, falls dies erwünscht ist.

[0034] Der Mikroorganismus kann nach bekannten Verfahren kultiviert und fermentiert werden. Bakterien können beispielsweise in TB- oder LB-Medium und bei einer Temperatur von 20 bis 40°C und einem pH-Wert von 6 bis 9 vermehrt werden. Im Einzelnen werden geeignete Kultivierungsbedingungen beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) beschrieben.

[0035] Die Zellen werden dann, falls Capn12 nicht in das Kulturmedium sezerniert wird, aufgeschlossen und die Capn12 nach bekannten Proteinisolierungsverfahren aus dem Lysat gewonnen. Die Zellen können wahlweise durch

hochfrequenten Ultraschall, durch hohen Druck, wie z. B. in einer French-Druckzelle, durch Osmolyse, durch Einwirkung von Detergenzien, lytischen Enzymen oder organischen Lösungsmitteln, durch Homogenisatoren oder durch Kombination mehrerer der aufgeführten Verfahren aufgeschlossen werden.

[0036] Eine Aufreinigung der Capn12 kann mit bekannten, chromatographischen Verfahren erzielt werden, wie Molekularsieb-Chromatographie (Gelfiltration), wie Q-Sepharose-Chromatographie, Ionenaustausch-Chromatographie und hydrophobe Chromatographie, sowie mit anderen üblichen Verfahren wie Ultrafiltration, Kristallisation, Aussalzen, Dialyse und nativer Gelelektrophorese. Geeignete Verfahren werden beispielsweise in Cooper, F.G., Biochemische Arbeitsmethoden, Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York oder in Scopes, R., Protein Purification, Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin beschrieben.

[0037] Besonders vorteilhaft ist es, zur Isolierung des rekombinanten Proteins Vektorsysteme oder Oligonukleotide zu verwenden, die die cDNA um bestimmte Nukleotidsequenzen verlängern und damit für veränderte Polypeptide oder Fusionsproteine kodieren, die einer einfacheren Reinigung dienen. Derartige geeignete Modifikationen sind beispielsweise als Anker fungierende sogenannte "Tags", wie z. B. die als Hexa-Histidin-Anker bekannte Modifikation oder Epitope, die als Antigene von Antikörpern erkannt werden können (beschrieben zum Beispiel in Harlow, E. and Lane, D., 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor (N.Y.) Press). Diese Anker können zur Anheftung der Proteine an einen festen Träger, wie z. B. einer Polymermatrix, dienen, die beispielsweise in einer Chromatographiesäule eingefüllt sein kann, oder an einer Mikrotiterplatte oder an einem sonstigen Träger verwendet werden kann.

[0038] Gleichzeitig können diese Anker auch zur Erkennung der Proteine verwendet werden. Zur Erkennung der Proteine können außerdem übliche Marker, wie Fluoreszenzfarbstoffe, Enzymmarker, die nach Reaktion mit einem Substrat ein detektierbares Reaktionsprodukt bilden, oder radioaktive Marker, allein oder in Kombination mit den Ankern zur Derivatisierung der Proteine verwendet werden.

[0039] Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung einer erfindungsgemäßen Capn12 oder eines erfindungsgemäßen Calpain-Proteins als Cystein-Protease. Bevorzugt ist die Verwendung in Verbindung mit natürlichen Substraten der Capn12, es können jedoch alle Substrate verwendet werden, die an das aktive Zentrum der Capn12 binden und dort gespalten werden. Die Capn12 kann so beispielsweise als Cystein-Protease in molekularbiologischen und chemischen Verfahren eingesetzt werden.

[0040] Gegenstand der Erfindung sind darüber hinaus pharmazeutische Mittel, die eine erfindungsgemäße Capn12, ein erfindungsgemäßes Calpain-Protein oder einen erfindungsgemäßen rekombinanten Vektor, sowie wenigstens einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder ein Verdünnungsmittel enthalten. Die erfindungsgemäße Capn12, das erfindungsgemäße Calpain-Protein oder der Vektor können als solche, vorzugsweise jedoch zusammen mit einem Träger oder Verdünnungsmittel verabreicht werden. Dieser Träger kann abhängig von der gewünschten Dosierungsform in fester oder flüssiger Form vorliegen. Geeignete pharmazeutische Mittel können außerdem neben einer erfindungsgemäßen Capn12, einem erfindungsgemäßen Calpain-Protein oder einem erfindungsgemäßen rekombinanten Vektor gewünschtenfalls noch weitere pharmazeutische Wirkstoffe im Gemisch oder getrennt in einem Kombinationspräparat enthalten. Beispielsweise können solche Wirkstoffe die Wirkung der enthaltenen Capn12, des Calpain-Proteins oder des Vektors verstärken, einen anderen Wirkmechanismus aufweisen und damit additiv wirken oder die Gesamtkonstitution des Patienten verbessern.

[0041] Gegenstand der Erfindung ist weiterhin die Verwendung einer erfindungsgemäßen Capn12, eines erfindungsgemäßen Calpain-Proteins oder eines erfindungsgemäßen Vektors zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krankheiten oder Krankheitszuständen, die in Zusammenhang mit einer unzureichenden Expression der Capn12 stehen. Dabei umfasst eine erfindungsgemäße Behandlung die Verhinderung der Ausbildung der Erkrankung bei einem Patienten mit einer entsprechenden Prädisposition oder die Therapie einer bereits bestehenden Erkrankung durch verlangsames Fortschreiten oder sogar durch Verbesserung des Zustandes des Patienten, möglicherweise bis zum völligen Ausheilen.

[0042] In Situationen, in denen ein Mangel an Capn12 herrscht, können mehrere Verfahren zur Substituierung eingesetzt werden. Zum einen kann in einem erfindungsgemäßen Medikament eine Capn12 oder ein erfindungsgemäßes Calpain-Protein direkt oder gentherapeutisch in Form ihrer kodierenden Nukleinsäuren (DNA oder RNA) appliziert werden. Zur gentherapeutischen Anwendung können beliebige Vehikel, beispielsweise sowohl virale (retrovirale Transfektion), als auch nicht-virale Vehikel (z. B. Liposomen-Transfektion) zum Einsatz kommen. Geeignete Vehikel können über geeignete Rezeptormoleküle oder dergleichen spezifisch an genau definierte Zielzellen binden und diese gezielt transformieren. Die Transfektion kann im Körper des Patienten erfolgen oder es werden entnommene Zellen in-vitro transfektiert und nachfolgend wieder dem Patienten appliziert. Geeignete Verfahren werden beispielsweise von Strauss und Barranger in Concepts in Gene Therapy (1997), Walter de Gruyter, Hrsg., beschrieben. Ein weiteres Verfahren zur Capn12-Substitution stellt die Stimulation des endogenen, körpereigenen Gens dar. Auch der turn-over oder die Inaktivierung erfindungsgemäßer Capn12, z. B. durch Proteasen, können blockiert werden, um eine erhöhte Zahl aktiver Capn12-Moleküle zu erreichen. Schließlich können Agonisten der Capn12 zum Einsatz gelangen, um die Aktivität vorhandener Capn12-Moleküle zu steigern. Bei verminderter Capn12-Expression kann dies nur ein die Therapie unterstützendes Verfahren sein.

[0043] Erfindungsgemäße pharmazeutische Mittel oder Medikamente können in Form von Tabletten, Granulaten, Pulver, Dragees, Pastillen, Pellets, Kapseln, Zäpfchen, Lösungen, Emulsionen und Suspensionen zur enteralen und parenteralen Verabreichung vorliegen. Vorzugsweise können erfindungsgemäße pharmazeutische Mittel in Gelen, Lotionen und Cremes zur kutanen Applikation enthalten sein.

[0044] Die jeweilige Dosierung erfindungsgemäßer pharmazeutischer Mittel oder Medikamente und der jeweilige Dosierungsplan obliegen der Entscheidung des behandelnden Arztes. Dieser wird in Abhängigkeit vom gewählten Verabreichungsweg, von der Wirksamkeit des jeweiligen Medikaments, von der Art und Schwere der zu behandelnden Erkrankung, von dem Befinden des Patienten und dessen Ansprechen auf die Therapie eine geeignete Dosis und einen geeigneten Dosierungsplan auswählen. So können z. B. die pharmakologisch wirksamen Substanzen an ein Säugetier (Mensch und Tier) in Dosen von etwa 0,5 mg bis 100 mg pro kg Körpergewicht pro Tag verabreicht werden. Sie können in Ein-

zeldosis oder in mehreren Dosen verabreicht werden.

[0045] Die Anwendungsgebiete umfassen Krankheiten und Krankheitszustände die im Zusammenhang mit einer unzureichenden Capn12-Expression stehen.

[0046] Gegenstand der Erfindung ist außerdem die Verwendung einer erfindungsgemäßen Capn12 oder eines erfindungsgemäßen Calpain-Proteins zum Screening auf Calpain-Protease-Effektoren. Unter Calpain-Protease-Effektoren sind beispielsweise Substanzen zu verstehen, die die Aktivität der Capn12 und/oder anderer Calpaine beeinflussen können, wie Aktivatoren oder Inhibitoren, oder solche, die auf die Substrate der Capn12 während der enzymatischen Katalyse wirken können oder Capn12-bindende Moleküle, wie Immunglobuline oder niedermolekulare Capn12-bindende Moleküle, die ebenfalls die biologische Funktion der Capn12 modulieren können. Unter Capn12-bindenden Molekülen versteht man alle natürlichen und synthetischen Liganden und Interaktionspartner der Capn12.

[0047] In einem geeigneten Screening-Verfahren wird beispielsweise die Capn12 oder ein erfindungsgemäßes Calpain-Protein mit einem Analyten inkubiert, welcher einen Effektor einer physiologischen oder pathologischen Capn12-Aktivität enthält, beispielsweise der Cystein-Protease-Aktivität, und die Aktivität der Capn12, gegebenenfalls durch Zugabe von Substraten und Cosubstraten bestimmt.

[0048] Den folgenden Verfahren liegt dagegen die Eigenschaft vieler Effektoren zugrunde, an das Zielprotein zu binden. So kann die Capn12 oder das erfindungsgemäße Calpain-Protein, gegebenenfalls nach entsprechender Derivatisierung, an einem Träger immobilisiert und mit einem Analyten in Kontakt gebracht werden, in welchem wenigstens ein Capn12-Bindungspartner vermutet wird. Die an die immobilisierte Capn12 oder das immobilisierte, erfindungsgemäße Calpain-Protein gebundenen Bestandteile des Analyten können dann gegebenenfalls nach einer Inkubationsphase eluiert, bestimmt und charakterisiert werden. Entsprechend kann aber auch der Analyt immobilisiert werden und anschließend auf Bindung von Capn12-Molekülen oder bindungsfähigen Capn12-Fragmenten an Bestandteile des Analyten hin untersucht werden.

[0049] Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Immunglobuline mit Spezifität für eine erfindungsgemäße Capn12. Solche Immunglobuline umfassen mono- oder polyklonale Antikörper, die an charakteristische Epitope der Capn12 binden können, sowie deren Fragmente. Die Herstellung von Anti-Capn12-Immunglobulinen erfolgt in einer dem Fachmann geläufigen Weise. Mit Immunglobulinen sind sowohl polyklonale, monoklonale, gegebenenfalls humane oder humanisierte Antikörper oder Fragmente davon, single-chain-Antikörper oder auch synthetische Antikörper gemeint, sowie Antikörperfragmente, wie Fv, Fab und F(ab)₂. Geeignete Herstellungsverfahren sind z. B. in Campbell, A.M., Monoclonal Antibody Technology, (1987) Elsevier Verlag, Amsterdam, New York, Oxford und in Breitling, F. und Dübel, S., Rekombinante Antikörper (1997), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg beschrieben. So können beispielsweise ausgehend von den erfindungsgemäßen Aminosäuresequenzen Peptide synthetisiert werden, die einzeln oder in Kombination als Antigene zur Herstellung monoklonaler oder polyklonaler Antikörper eingesetzt werden können.

[0050] Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung erfindungsgemäßer Immunglobuline oder erfindungsgemäßer Polynukleotide zur Diagnose von Krankheiten oder Krankheitszuständen, die im Zusammenhang mit der Capn12-Expression stehen. Dabei kann die Menge, Aktivität und Verteilung der Capn12 oder ihrer zugrunde liegenden mRNA im menschlichen Körper bestimmt werden. Mit Hilfe von Immunglobulinen oder Capn12-bindenden Molekülen läßt sich beispielsweise die Capn12-Konzentration in biologischen Proben, z. B. Zellen oder Körperflüssigkeiten, bestimmen. Mit Hilfe erfindungsgemäßer Polynukleotide läßt sich beispielsweise mittels Northern-Blot-Technik oder RT-PCR die Expression auf mRNA-Ebene beurteilen und beispielsweise eine Minderexpression nachweisen und eine damit verbundene Krankheit diagnostizieren. Außerdem lassen sich mit Hilfe erfindungsgemäßer Polynukleotide in Form geeigneter Sonden Gendefekte oder Mutationen bezüglich des Capn12-Gens und damit die Prädisposition eines Patienten für bestimmte Krankheiten nachweisen. Weiterhin lassen sich aus der Untersuchung einer großen Anzahl von Patienten im klinischen Monitoring Aussagen über genetische Ursachen und Prädispositionen bestimmter Erkrankungen machen.

[0051] Die Erfindung wird nun in den folgenden nichtlimitierenden Beispielen unter Bezugnahme auf die beiliegenden Figuren näher beschrieben. Dabei zeigt:

[0052] Fig. 1 einen Sequenzvergleich der vorhergesagten Aminosäuresequenz der Capn12 mit repräsentativen Mitgliedern der Wirbeltier-Genfamilie der großen Calpain-Untereinheit:

Die vorhergesagte Aminosäuresequenz (hier dargestellt im Ein-Buchstaben-Code) der Splice-Variante Capn12A wurde mit Mitgliedern der wichtigsten Klassen der großen Calpain-Untereinheit verglichen, die sich durch verschiedene C-terminale Domänen unterscheiden. Capn1 besitzt eine klassische Calmodulin-ähnliche, C-terminale Domäne, während Capn5, Capn7 und Capn10 C-terminale Domänen aufweisen, die mit N, T bzw. X bezeichnet sind. Aminosäuren anderer Proteine, die zu denen der Capn12 identisch sind, sind schwarz hinterlegt. Bindestriche kennzeichnen Lücken, die zur Gegenüberstellung und damit zum bestmöglichen Vergleich der Sequenzen eingefügt wurden. Die drei konservierten Aminosäuren, die Teil des aktiven Zentrums der Calpaine sind, sind mit Pfeilen markiert. Die Calcium-bindenden EF-Hand-Domänen von Capn1 (Lin et al., 1997; Blanchard et al., 1997) sind durch einen Balken über der jeweiligen Sequenz hervorgehoben und abschnittsweise nummeriert. Die aus der Kristallstruktur vorhergesagten (Hosfield et al., 1999) Calpain-Domänen sind ebenfalls gekennzeichnet. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die ersten 122 Aminosäuren des vorhergesagten Capn7-Proteins, die nur dieses Protein aufweist, nicht angegeben und durch ein "Gleichheitszeichen" (=) ersetzt. Die ausgesprochen saure Region in Domäne III, die mit Calcium interagieren kann und möglicherweise als "elektrostatistischer Schalter" der Protease-Aktivität wirkt, ist durch Kreise über der relevanten Sequenz kenntlich gemacht. Die von der Splice-Variante A abweichenden C-terminalen Enden der aus der 914413-cDNA vorhergesagten Proteinsequenz und der vorhergesagten Proteinsequenzen der Splice-Varianten B und C sind von dem Punkt an gezeigt, an dem sie sich von der Proteinsequenz der Splice-Variante Capn12A unterscheiden. Die EMBL/Genbank-Zugangsnummern der Calpain-Sequenzen sind in der Legende zu Fig. 3 angegeben.

[0053] Fig. 2 die genomische Struktur des Capn12-Gens:

A. Schematisches Diagramm der Intron/Exon Struktur des Capn12-Gens. Die schwarzen Rechtecke stehen für Exons der Capn12. Diese sind fortlaufend nummeriert. Das karierte Rechteck kennzeichnet das am äußersten 3'-Ende gelegene Exon von Actn4. Das gepunktete Rechteck kennzeichnet die Exonsequenz, die sich Capn12 und Actn4 teilen. Die Pfeile

geben die Transkriptionsrichtung beider Gene an. Die Lage der Sequenzwiederholungen, die man in der Sequenz entdeckte, sind oben angegeben. Das Splice-Ereignis zwischen den Exons 9 und 20, aus dem das mRNA-Transkript des Klon 914413 resultierte und die Teilsequenzen, die Splice-Donor- und Splice-Akzeptorstelle der Exons 9 und 20 der Capn12 umgeben, sind ebenfalls angegeben. Große Buchstaben kennzeichnen jeweils die kodierende Sequenz und kleine Buchstaben die Intronsequenz. Die Sequenz CACTG, die der anomalen Splice-Donor- und der Splice-Akzeptorstelle gemeinsam ist und in der das anomale Splice-Ereignis auftrat, ist unterstrichen. Die sich daran anschließende Sequenz der 914413-cDNA, die diese zwei Exons miteinander verbindet, ist ebenfalls angegeben.

B. Ein schematisches Diagramm der Exons 11, 12 und 13 zeigt die alternativen Splice-Varianten A, B und C. Die Sequenz des gemeinsamen Exons 11 ist auf der linken Seite gezeigt und das damit verbundene Exon, das in der jeweiligen Splice-Variante verwendet wird, auf der rechten Seite. Die vorhergesagte Aminosäuresequenz ist unter der entsprechenden Nukleotidsequenz angegeben. Die letzten zwei Nukleotide des Splice-Akzeptors in Exon 12, AG, die in Splice-Variante B verwendet werden, sind fettgedruckt dargestellt.

C. Die Tabelle zeigt die Splice-Ereignisse der einzelnen Exons mit der den jeweiligen Splice-Donor und Splice-Akzeptor umgebenden Nukleotidsequenz. Splice-Donor und Splice-Akzeptor sind fettgedruckt dargestellt. Die Größe der jeweiligen Exons und Introns ist angegeben.

[0054] Fig. 3 den phylogenetischen Stammbaum der Säugetier-Genfamilie der großen Calpain-Untereinheit:

Die Analyse wurde mit Hilfe des Programms CLUSTAL durchgeführt, der Stammbaum wurde mit CLUSTREE erstellt. Die jeweilige Länge der horizontalen Linien ist proportional zum vermuteten phylogenetischen Abstand; die vertikalen Abstände haben keine Bedeutung. Es wurden 1000 Bandwiederholungen durchgeführt und die Werte sind in den inneren Knotenpunkten angegeben. Es wurden vorzugsweise Sequenzen der Maus verwendet. Da diese nicht für Capn8, Capn9 und Capn11 verfügbar sind, wurden ersatzweise die orthologen Sequenzen der Ratte und des Menschen verwendet. Die EMBL/Genbank-Zugangsnummern der Sequenzen sind: Capn1 (AF021847), Capn2 (X10139), Capn3 (X92523), Capn5 (Y10656), Capn6 (Y12582), Capn7 (AJ012475), Ratte Capn8 (D14480), Mensch CAPN9 (AF022799), Capn10 (AF126867) und Mensch CAPN11 (AJ242832).

[0055] Fig. 4 eine mRNA-Expressionsanalyse von Actn4 und Capn12:

A. Expression von Actn4 in verschiedenen Mausgeweben. Eine 32 P-markierte Probe, die dem 3'-Ende der Actn4-cDNA der Maus entsprach, wurde an einen Clontech Mouse-Master-Blot hybridisiert. Die Lokalisation der RNAs auf den Filtern ist auf der rechten Seite angegeben. Der Blot wurde gestript und mit einer Maus Hprt-Probe hybridisiert (in der Mitte), um die RNA-Beladung zu überprüfen. Die Expositionszeit betrug 48 Stunden.

B. Eine 32 P-markierte Probe wurde an einen Northern-Filter, der RNAs aus der Haut von Mäusen angegebenen Alters trug, hybridisiert. Der Blot wurde zur Überprüfung der aufgetragenen RNA-Level anschließend ein weiteres Mal mit einer β -Actin-cDNA-Probe hybridisiert. Die Positionen der 28S- und 18S-rRNAs sind gekennzeichnet und die spezifische Capn12-RNA-Bande mit einem Pfeil markiert. Die Expositionszeit bei der Capn12 betrug 144 Stunden und 2 Stunden bei β -Actin.

C. Capn12-RT-PCR von RNAs der Haut verschiedenen postnatalen Alters. M, pSM verdaut mit HindIII als Molekulargewichtsmarker. Die Größe der Banden ist in Basenpaaren angegeben. Neg, negative Kontrolle ohne eingesetzte DNA. Die Sequenzierung der hervorgehobenen PCR-Produkte bestätigte, dass die verstärkte Bande der Capn12-cDNA entspricht.

[0056] Fig. 5 eine in-situ-Hybridisierung an Hautgewebeschnitten aus Mausembryonen:

Auf der linken Seite sind lichtmikroskopische Aufnahmen der Gewebeschnitte dargestellt. Rechts daneben ist das entsprechende Bild der in-situ-Hybridisierung zu sehen. Die Capn12 wird selektiv im Cortex des Haarfollikels exprimiert (irs: inner root sheet; ors: outer root sheet; co: cortex).

Beispiel 1

Screening einer genomischen Bibliothek

[0057] Eine Cosmid-Bibliothek, erstellt durch Klonierung von partiell durch Sau3A verdauter Maus-129/Sv-DNA in den Cosmidvektor pSuper-Cos (Stratagene), wurde durch PCR-Analyse unter Verwendung der Capn12-spezifischen Primer 5'-gaatggcgagtggcaacaggaag-3' (SEQ ID NO: 9) und 5'-tggggctcagcacaaaactcat-3' (SEQ ID NO: 10) gescreent. Die Cosmid-DNA wurde mit Hilfe des Qiagen Plasmid Midi Kits gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt.

Beispiel 2

cDNA-Amplifikation durch PCR

[0058] Fünf Mikrogramm Gesamt-RNA wurden mit AMV Reverse Transkriptase unter Verwendung des Promega Reverse Transkription Systems in cDNA transkribiert. Die PCRs wurden in 50 μ l Reaktionsvolumen, die 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9, 0,1% Triton X-100, 2 Units Taq DNA-Polymerase, 50 μ mol sowohl der Vorwärts- als auch der Rückwärtsprimer und 0,1 ng cDNA enthielten, mit einem Thermocycling-Protokoll von 35 Zyklen, umfassend 15 s bei 94°C, 30 s bei 55°C und 1 min bei 72°C, durchgeführt. Die Capn12 Vorwärts- und Rückwärtsprimersequenzen zur RT-PCR waren 5'-tcaagactttctcagc-3' (SEQ ID NO: 11) und 5'-tcgcccccttgagttattctga-3' (SEQ ID NO: 12). Die Hprt Vorwärts- und Rückwärts-Primersequenzen waren 5'-atgccgacccgcagtcacagc-3' (SEQ ID NO: 13) und 5'-ggcttggattggctttccc-3' (SEQ ID NO: 14).

Beispiel 3

DNA-Sequenzierung

- 5 [0059] Ein 20 µl-Reaktionsgemisch, das 8 µl BigDye Reaktion Mix (Perkin-Elmer Biosystems), 500 ng gereinigte DNA und 10 µmol Primer enthält, wurde 30 Zyklen, umfassend 15 s bei 94°C, 15 s bei 50°C und 2 min bei 60°C, inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter Verwendung eines ABI 377 DNA-Sequencers aufgetrennt und die Sequenz durch Dye-Terminator-Fluoreszenz mit Hilfe der Perkin-Elmer Biosystems Sequenzanalyse Software Version 3,3 sequenziert. Weitere Sequenzierung mit synthetisierten Oligonukleotiden erweiterte
10 die DNA-Sequenzen. Die Sequenzen wurden mit Hilfe des SeqMan der Programmreihe DNASTAR zu einem Contig zusammengesetzt.

Beispiel 4

Sequenzanalysen

- [0060] DNA- und Aminosäuresequenzen wurden bezüglich ihrer Homologie mit den nicht-redundanten Nukleotid-, Protein- und EST-Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) mit Hilfe der Programmreihe-BLAST (Altschul et al., 1990) untersucht. Der Sequenzvergleich und die Gegenüberstellung
20 Von Aminosäuresequenzen wurde mit CLUSTAL W (Thompson et al., 1994) durchgeführt. Die Vorhersage der Exons war mit Hilfe des FGNNESH-Programms möglich, das über den Sanger Center Web-Server (www.sanger.ac.uk) erhältlich ist. Repetitive Sequenzen wurden unter Verwendung des "RepeatMasker" (<http://repeatmasker.genome.washington.edu>) identifiziert. Die phylogenetische Analyse wurde mit dem Programm CLUSTREE, erhältlich vom HU-SAR-Server des Deutschen Krebsforschungszentrums, Heidelberg (WWW.dkfz-heidelberg.de) durchgeführt.

Beispiel 5

Northern-Blot-Hybridisierung

- 30 [0061] Die Gesamt-RNA aus Mausgeweben wurde mit Hilfe der Guanidin-ISO-thiocyanat-Methode (Chomzynski und Sacchi, 1987) isoliert. 10 µg Gesamt-RNA wurden durch Elektrophorese in einem 1,4% (w/v) Agarosegel, das wie bereits beschrieben 2,2 M Formaldehyd enthielt (Sambrook et al., 1989), aufgetrennt und gemäß den Herstellerangaben auf eine Hybond-N-Nylonmembran (Amersham) gebロット. Der Blot wurde mit einem ³²P-markierten cDNA-Fragment, das den Nukleotiden 33-852 cDNA-Sequenz der Capn12 entsprach in Expresshyb Hybridisierungslösung (Clontech) hybridisiert. Die Bedingungen der Hybridisierung und des hochstringenten Waschens wurden gemäß den Herstellerangaben
35 gewählt. Der Blot wurde in einem zweiten Schritt mit einer cDNA-Probe des β-Actins hybridisiert, um die RNA-Beladung zu überprüfen.

Beispiel 6

In-situ-RNA-Hybridisierung an Gewebeschnitten

- [0062] Die Capn12-cDNA, die als Template zur Synthese von RNAs, entsprechend den Nukleotiden 33-852 der beschriebenen Sequenz, verwendet wurde, wurde in die EcoRV-Stelle des pBluescripts kloniert. Dieses cDNA-Fragment überlappt nicht mit dem Actn4-Gen. ³³P-markierte Sense- und Antisense-RNAs wurden durch in-vitro-Transkription von
45 Restriktionsenzym-linearisierter Plasmid-DNA in einem Reaktionsvolumen von 12,5 µl, das 1 × Transkriptionspuffer (Puffer für T7- und T3-RNA Polymerasen, von Statagene), 200 µM ATP, CTP, GTP, 40 µCi α-³³P-UTP (Amersham), 10 mM DTT, 1 µg linearisierte Plasmid-DNA, 40 Units RNasin (Promega) und 10 Units RNA-Polymerase enthielt, hergestellt. Nach 2-stündiger Inkubation bei 37°C wurde die Template-DNA durch Zugabe von 2 Units DNAaseI (Boehringer Mannheim) gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C entfernt. Die Reaktion wurde extrahiert, mit Ethanol präzipitiert und in 26 µl DEPC-behandeltem dH₂O resuspendiert. Die Embryos wurden in 4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS fixiert und daraus erhaltene 5 µm-Gewebeschnitte wurden auf vorgereinigte SuperFrost Plus-Objektträger (Menzel-Glaeser) überführt. Die Hybridisierungs- und Waschbedingungen waren wie bereits beschrieben (Dressler und Gruss, 1989). Es wurde eine Hybridisierungstemperatur von 55°C gewählt.

Beispiel 7

Bestrahlungshybridkartierung

- 60 [0063] Die DNAs der T31-Bestrahlungshybridkartierungsplatte (Research Genetics) wurden durch PCR mit Hilfe zweier, der Capn12 [Set 1: 5'-gggaggccaggacaaggact-3' (SEQ ID NO: 15), 5'-agggaaggctggacaatggagaa-3' (SEQ ID NO: 16), Set 2: 5'-gaatggcgagtggcaacaggaag-3' (SEQ ID NO: 17), 5'-ctggggctcagcacaactcat-3' (SEQ ID NO: 18)] und der Capn5 (Set 1: 5'-cggtgacactggactggcccttgc-3' (SEQ ID NO: 19), 5'-aagccgctgcagagcactgtgg-3' (SEQ ID NO: 20); Set 2: 5'-cgggagtggacgggcccctg-3' (SEQ ID NO: 21), 5'-ctcactttctgcactectc-3' (SEQ ID NO: 22)) entsprechenden Primersets, analysiert. Die PCRs wurden in einem Reaktionsvolumen von 20 µl, das 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9, 1,5 mM MgCl₂, 1 Unit Taq DNA-Polymerase, 25 ng DNA mit einem Thermocycling-Protokoll von 35 Zyklen, umfassend 15 s bei 94°C, 30 s bei 60°C und 1 min bei 72°C, durchgeführt. Die Rohdaten wurden zur Analyse bei der Maus-Bestrahlungshybrid-Datenbank, im Jackson Laboratory (www.jax.org/resources/documents/cmdata/rhmap/) eingereicht.

[0064] Zur Identifizierung neuer Calpaingene durchsuchte man die öffentlich zugänglichen EST-Datenbanken. Unter Verwendung der vorläufig erhaltenen Daten, wurde ein neues Mitglied der Säugetier-Genfamilie der großen Calpain-Untereinheit, die durch ein zellspezifisches Expressionsmuster charakterisiert ist, gefunden und charakterisiert. 5

[0065] Die Maus-EST-Datenbank wurde mit Proteinsequenzen von bekannten Wirbeltier-Calpainen unter Verwendung des TBLAST-Algorithmus (Altschul et al., 1990) durchsucht. Das translatierte Protein eines 3'-EST, AA1314413, war für die Familie der großen Calpain-Untereinheit typisch. Aus diesem Grund wurde der cDNA-Klon, 914413, der diesem EST-Klon entspricht, in seiner Gesamtheit sequenziert. Die cDNA weist einen PolyA-Schwanz auf und enthält ein offenes Leseraster, dessen vorhergesagtes Protein Homologie zu den Domänen I und II der großen Untereinheit der klassischen Calpain zeigt. Die vorhergesagte Sequenz weicht allerdings von der klassischen Calpain im Anschluß an die Domäne II ab und endet kurz darauf (Fig. 1). 10

[0066] Drei Beobachtungen deuten an, dass dieser cDNA-Klon von einem anomalen Transkript stammt. Erstens, weist das offene Leseraster keine Homologie zu den Domänen III oder IV anderer Calpaine auf, während alle bisher identifizierten Calpaine eine typische Vier-Domänen-Struktur aufweisen. Zweitens, war es nicht möglich, mit Primern, die aus den beiden Enden der erhaltenen Sequenz konstruiert wurden, aus einer großen Zahl von Gewebe-cDNAs ein Transkript dieser Länge zu amplifizieren. Drittens, wurden zum 3'-Ende von AA1314413 homologe, humane ESTs identifiziert, von denen manche Homologie zu der Calmodulin-ähnlichen Domäne IV der Calpaine zeigten. Daher scheint der cDNA-Klon 914413 das Ergebnis eines atypischen oder fehlerhaften RNA-Splicing-Ereignisses zu sein, das die für die Domänen III und IV kodierenden Exons dieses Calpain-Gens deletiert hat. 15

[0067] Um dies zu überprüfen wurde ein genomischer DNA-Cosmidklon isoliert und sequenziert. Man erhielt eine fortlaufende Sequenz (SEQ ID NO: 8) von insgesamt 13116 bp. Die Genvorhersagesoftware (FGE-NESH) identifizierte ein potentiell Gen mit 21 Exons, mit einer Exon/Intron-Struktur, die typisch für die Genfamilie der Calpaine ist. Darunter sind Exons mit ausgeprägter Homologie zu den Domänen III und IV der klassischen Calpaine. Zur Bestimmung der genauen Exon/Intron-Struktur analysierte man aus der Haut isolierte mRNA mittels RT-PCR. Die Software sagte 20 der 21 Exons vorher, wobei sie einige Fehler in der Position der Donor- oder der Akzeptor-Splice-Stelle erlaubt. Die Intron/Exon-Grenzen des vollständigen Gens sind in Fig. 2A gezeigt und in Tabelle 1 zusammengefaßt. Das Nomenklatur-Komitee des Maus-Genoms gab diesem Gen den Namen Capn12. Man fand in der Capn12-Intronsequenz vier einfache Sequenzwiederholungen und 16 SINES (short interspersed repeats; 4 B1, 1 B2, 3 B4 und 8 ID; Fig. 2A). Im Vergleich zu der aus der genomischen Sequenz vorhergesagten mRNA-Sequenz scheint der cDNA-Klon 914413 das Ergebnis eines fehlerhaften Splice-Ereignisses zu sein, denn sowohl die Donor- als auch die Splice-Akzeptorstelle sind atypisch und der größte Teil der Exons der Domänen III und IV wird dadurch deletiert. Der Splice findet zwischen den Exons 9 und 20 innerhalb einer 5-Basenpaarregion, CACTG, statt, die diesen beiden Exons gemeinsam ist (Fig. 2A). 25

[0068] Mittels RT-PCR wurden drei alternative Splice-Varianten der Capn12-mRNA identifiziert (hier Capn12A, Capn12B und Capn12C genannt). Die Splice-Variante A weist ein offenes Leseraster auf, das vermutlich ein Protein aus 720 Aminosäuren (M_r 80,5 kDa) kodiert. Das vorgeschlagene Start-Methionin (cgaATGg) entspricht der minimalen Konsensussequenz der Translationsstartstelle (Kozak, 1996). Weitere 5'-Startstellen werden durch ein TAA-Stopcodon im Leseraster ausgeschlossen, das 39 Nukleotide strangaufwärts dieses ATG lokalisiert ist. Die vorhergesagte Aminosäuresequenz zeigt Ähnlichkeiten zu Mitgliedern der Familie der großen Calpain-Untereinheit und kann in die für Calpaine typischen vier Domänen I bis IV unterteilt werden (Fig. 1). Die Domäne II der erfindungsgemäßen Capn12 weist die drei Aminosäurereste (Cys105, His259 und Asn283) auf, die für das aktive Zentrum von Cystein-Proteasen wesentlich sind (Berti und Storer, 1995). Demgemäß weist die erfindungsgemäße Capn12, wie die meisten klassischen Calpaine, Cystein-Protease-Aktivität auf. 30

[0069] Jede der fünf, der bei der Capn2 beschriebenen Ca^{2+} -bindenden Sequenzen (Blanchard et al., 1997; Lin et al., 1997) ist in gewissem Ausmaß in der Aminosäuresequenz der Capn12 konserviert (Fig. 1). Die Kristallstruktur der Capn2 brachte eine extrem saure Region in der Domäne III zum Vorschein, die mit Ca^{2+} interagieren und als "elektrostatistischer Schalter" der Protease-Aktivität wirken könnte (Strobl et al., 2000). Die Autoren vermuten, dass die große Zahl saurer Reste in dieser Region die für die Aktivierung notwendige Ca^{2+} -Konzentration reduzieren könnte. Die entsprechende Region der Capn12 ist ebenso ausgeprägt sauer (DEEEDDDDEE; Fig. 1). Insgesamt legt die primäre Aminosäuresequenz somit nahe, dass dieses Protein Cystein-Protease-Aktivität aufweist und Calcium bindet. Ein Vergleich der vorhergesagten Aminosäuresequenz mit anderen Vertebraten- und Invertebraten-Calpainen zeigte starke Sequenzhomologie zur Capn1 des Menschen und der Maus (39,9% bzw. 39,75%). 35

[0070] Die Transkripte der Splice-Varianten A und B unterscheiden sich im Splice-Akzeptor des Exons 12, während der Variante C das Exon 12 ganz fehlt. Die vorhergesagten Proteine der alternativen Splice-Varianten B und C zeigen dadurch eine in der Domäne III abweichende Aminosäuresequenz und aufgrund eines Shifts im Leseraster endet die Translation innerhalb dieser Domäne (Fig. 2B). Folglich fehlt ihnen vermutlich auch die Calmodulin-ähnliche, Ca^{2+} -bindende Domäne, C-terminale Domäne. Analog dazu wurde bereits gezeigt, dass auch die Capn8 der Ratte und die Capn5 der Maus alternativ gespliced Transkripte bilden, die Proteine kodieren, denen die C-terminale Domäne fehlt (Sorimachi et al., 1993; Dear et al., 1997). Überraschenderweise war das RT-PCR-Produkt der Splice-Variante B abundanter als das der Splice-Variante A. Somit stellt vermutlich ein Capn12-Protein, dem eine Ca^{2+} -bindende Domäne fehlt einen beträchtlichen Teil des Capn12-Proteinpools dar. Das RT-PCR-Produkt der Splice-Variante C war dagegen das am wenigsten abundante. 40

Beispiel 9

Phylogenetische Analyse der großen Calpain-Untereinheit der Säugetiere

- 5 [0071] Die jeweils vollständigen Aminosäuresequenzen repräsentativer Mitgliedern aller bekannten großen Calpain-Untereinheiten der Säugetiere wurden einer phylogenetischen Analyse unterzogen. Dadurch konnte man die Calpaine in drei Hauptgruppen einteilen (Fig. 3). Die erste Gruppe (A) wird durch Capn1, Capn2, Capn3, Capn8 und Capn9 repräsentiert und die zweite Gruppe (B) durch Capn5, Capn6, Capn7, Capn10 und Capn12. Capn11, ein stark abweichendes Calpain (Dear et al., 1999), passt in keine der Gruppen. Gruppe (A) enthält alle Calpaine mit einer Calmodulin-ähnlichen, C-terminalen Domäne, während Gruppe (B) all jene "atypischen" Calpaine enthält, denen vermutlich die Fähigkeit zur Ca^{2+} -Bindung fehlt. Eine Ausnahme stellt die Capn12 dar, die im Allgemeinen der Gruppe (B) ähnlicher ist, abgesehen davon, dass sie eine Calmodulin-ähnliche, C-terminale Domäne aufweist. Darüberhinaus legt die phylogenetische Analyse die Vermutung nahe, dass die Capn12 das älteste Mitglied dieser Gruppe ist. Folglich könnte ein Vorläufer des Capn12-Gens der Begründer der Gene der atypischen großen Calpain-Untereinheit sein, wobei die Capn12 über alternatives Splicing möglicherweise als Quelle sowohl klassischer als auch atypischer Proteine gedient hat.

Beispiel 10

Chromosomen-Lokalisation

- 20 [0072] Die Lokalisation des Capn12-Gens auf Chromosomen der Maus wurde durch PCR-Analyse der T31-Strahlungshybridkartierungsplatte mit Hilfe von Primern bestimmt, die innerhalb des Introns 1 des Capn12-Gens binden. Die Rohdaten wurden unter Verwendung der Bestrahlungshybridkarte des Maus-Genoms (Van Etten et al., 1999) und dem dazugehörenden World Wide Web Server analysiert. Der höchste LOD-Wert lag bei 16, in Verbindung mit dem Marker D7Mit72. Andere hohe LODs lagen bei 14,4 in Verbindung mit D7Mit116, 14,4 in Verbindung mit D7Mit77, und 13,9 in Verbindung mit D7Mit267. Diese Marker wurden auf Chromosom 7 bei 9,4 (D7Mit77), 10,7 (D7Mit116), 10,4 (D7Mit72), und 11,0 cM (D7Mit267) lokalisiert. Die schlüssigste Reihenfolge ist: proximal – D7Mit77 – D7Mit116 – D7Mit72 – Capn12 – D7Mit267 – distal. Die Region ist ortholog zum humanen Chromosom 19q13. Das Capn5-Gen der Maus wurde kürzlich ebenfalls mit Hilfe einer Bestrahlungshybridkartierungsplatte der Chromosomen somatischer Zellen der Maus auf dem Maus-Chromosom 7 lokalisiert (Matena et al., 1998). Um den genauen Abstand zwischen Capn5 und Capn12 auf dem Chromosom 7 zu bestimmen, wurde die T31-Platte mit Maus-Capn5-spezifischen PCR-Primern ausgewertet. Der höchste LOD-Wert lag bei 13,4 in Verbindung mit D7Mit321. Andere hohe LODs lagen bei 10,9, 8,5 und 6,9 in Verbindung mit D7Mit184, D7Mit171 bzw. D7Mit39. Die schlüssigste Reihenfolge dieses Locus ist: proximal – D7Mit321 – 7cR – Capn5 – 42cR – D7Mit149 – distal. Der D7Mit321-Marker wurde bei 48,5 cM auf Chromosom 7 lokalisiert. Somit sind Capn5 und Capn12 syntenisch, liegen aber in deutlichem Abstand voneinander auf Chromosom 7. Da die Gene Actn4 und Capn12, wie nachfolgend beschrieben, überlappen, muß Actn4 ebenfalls auf dem Maus-Chromosom 7 liegen. Da das humane Actn4-Gen auf dem Chromosom 19q13 lokalisiert wurde (Kaplan et al., 2000), liegt das humane Capn12-Ortholog sehr wahrscheinlich ebenfalls in dieser Region.

Beispiel 11

Expressionsanalyse

- 45 [0073] Eine erste in-situ-Hybridisierungsanalyse an Gewebeschnitten aus Maulembryonen, die mit Hilfe der 914413-cDNA zur Herstellung strängspezifischer RNA-Proben durchgeführt wurde, führte dadurch zu verwirrenden Ergebnissen, da die als Kontrolle eingesetzte Sense-RNA, die an den Nonsense-Strang von Capn12 hybridisieren sollte, in jedem Experiment ein Hybridisierungssignal lieferte. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist, dass der Nonsense-DNA-Strang ebenfalls eine RNA kodiert. Untersuchungen der DNA-Gendatenbank identifizierte über 200 ESTs, die dem 3'-Ende des Capn12-Gens entsprechen. Jedoch entsprechen alle ESTs, mit Ausnahme von AA914413, dem nicht-kodierenden Strang. Die Abfolge überlappender ESTs bildete eine Sequenz mit einem offenen Leseraster, die für das Maus-Ortholog von α -Actinin-4 (Actn4) kodiert. Die RT-PCR verschiedener Maulgewebe-RNAs bestätigte die Sequenz. Das vorhergesagte Mausprotein ist mit dem humanen Actn4 zu 98,9% identisch. Das letzte Exon überlappt mit dem letzten Exon des Capn12-Gens um 330 bp. allerdings in entgegengesetzter Orientierung (Fig. 2). Man konnte kürzlich zeigen, dass Mutationen im humanen Actn4-Gen familiäre segmentale Herdnephritis verursachen kann (Kaplan et al., 2000).
- 50 [0074] Eine RNA-Dot-Blot-Analyse und in-situ-Hybridisierung unter Verwendung einer spezifischen Probe zeigte, dass das Actn4-Gen ubiquitär exprimiert wird (Fig. 4). Im Gegensatz dazu war es nicht möglich, in einer von über 30 verschiedenen geistete Poly(A⁺)-RNA-Isolierungen aus adultem oder embryonalem Gewebe mit Capn12-spezifischen cDNA-Proben ein Hybridisierungssignal zu erhalten. Obwohl der 914413-cDNA-Klon aus einer Brustdrüsen-cDNA-Bibliothek isoliert wurde, zeigten Northern-Blot- und RT-PCR-Analyse in diesem Gewebe keine signifikanten Expressionslevel. Erst eine genauere RT-PCR-Analyse in Verbindung mit einer in-situ-Hybridisierung an Mausembryonen der Stadien dE10,5 bis dE18,5 und verschiedenen adulten Geweben zeigten, dass Capn12 ausschließlich in der Haut exprimiert wird. Hier wird Capn12 im Cortex des Haar-follikels exprimiert (Fig. 5).
- 60 [0075] Haare unterliegen einem Zyklus, der bei der Maus ungefähr 25 Tage dauert (Chase, 1965). Der Zyklus ist grob in drei Phasen unterteilt: Die Anagen- (Proliferations-), die Katagen- (Rückbindungs-) und die Telogen-Phase (Ruhephase). Die Rückenhaul der adulten Maus enthält Haarfollikel aller Phasen des Haarzyklus. Um genauer zu ermitteln, in welchen Phasen des Zyklus die Capn12-mRNA exprimiert wird, wurden von Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Geburt Proben aus der Rückenhaul entnommen und die extrahierten RNAs durch Northern-Blot-Hybridisierung

untersucht. Der erste Haarzyklus der Maus verläuft synchron (Chase, 1965) und somit können relativ reine Haarfollikel-Populationen einer spezifischen Zyklus-Phase untersucht werden. Eine Capn12-mRNA von ungefähr 3,5 kb kann in der Anagenphase (ungefähr P1-P16), aber nicht in der Telogenphase (P19-P25) (Fig. 4B) nachgewiesen werden. Die mRNA erreicht ihr höchstes Expressionslevel ungefähr am Tag P12, in der Mitte der Anagenphase. Eine RT-PCR-Analyse derselben Hautproben bestätigte dieses Ergebnis (Fig. 4C). Somit zeigt Capn12 ein hochspezifisches mRNA-Expressionsmuster.

[0076] Die Genfamilie der großen Calpain-Untereinheit kann aufgrund verschiedener Kriterien unterteilt werden, wie oben erwähnt z. B. aufgrund der Proteinstruktur. Ein weiteres Klassifizierungskriterium ist die ubiquitäre gegenüber der gewebespezifischen Expression. Capn1, Capn2, Capn7 und Capn10 scheinen ubiquitär exprimiert zu werden, während die anderen Calpaine durch unterschiedlich stark ausgeprägte gewebsspezifische Expression charakterisiert sind. Beispielsweise wird Capn9 vorwiegend im Darm und Magen exprimiert, ist aber auch in anderen Geweben nachweisbar (Li et al., 1998). Dagegen wird Capn11 offenbar ausschließlich in bestimmten Zellen der Testis exprimiert (Dear und Boehm, 1999). Darüber hinaus werden manche Calpain-Gene Entwicklungsspezifisch exprimiert. Capn5 wird beispielsweise im embryonalen Thymus in den T-Zell-Vorläufern exprimiert, während nach der Geburt die Expression im Thymus herunterreguliert wird (Dear und Boehm, 1999).

REFERENCES

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. und Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment sequencing tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410
- Berti, P.J. und Storer, A.C. (1995). Alignment/Phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases. *J. Mol. Biol.* 246: 273-283
- Blanchard, H., Grochulski, P., Li, Y., Arthur, J.S.C., Davies, P.L., Elce, J. S. & Cygler, M. (1997). Structure of a Ca^{2+} -binding domain reveals a novel EF-hand and Ca^{2+} -induced conformational changes. *Nature Struct. Biol.* 4: 532-538
- Braun, C., Engel, M., Theisinger, B., Welter, C. und Seifert, M. (1999). CAPN 8: isolation of a new mouse calpain-isoenzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260: 671-675
- Carafoli, E. und Molinari, M. (1998). Calpain: a protease in search of a function? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247: 193-203
- Chan, S.L. und Mattson, M.P. (1999). Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death. *J. Neurosci. Res.* 58: 167-190
- Chase, H.B. (1965). Cycles and waves of hair growth. In: Lyne, A.B., Short, B.F. (Eds.). *Biology of the Skin and Hair Growth*. Angus und Robertson, Sydney, pp. 462-465
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159
- Dear, T.N. und Boehm, T. (1999). Diverse mRNA expression patterns of the mouse calpain genes Capn5, Capn6 and Capn11 during development. *Mech. Dev.* 89: 201-209
- Dear, N., Matena, K., Vingron, M. und Boehm, T. (1997). A new subfamily of vertebrate calpains lacking a calmodulin-like domain: Implications for calpain regulation and evolution. *Genomics* 45: 175-184
- Dear, T.N., Moller, A. und Boehm, T. (1999). CAPN11: A calpain with high mRNA levels in testis and located on chromosome 6. *Genomics* 59: 243-247
- Dressler, G.R., Gruss, P. (1989). Anterior boundaries of Hox gene expression in mesoderm-derived structures correlate with the linear gene order along the chromosome. *Differentiation* 41, 193-201
- Franz, T., Vingron, M., Boehm, T. und Dear, T.N. (1999). Capn7: A highly divergent vertebrate calpain with a novel C-terminal domain. *Mamm. Genome* 10: 318-321
- Hardman, M.J., Sisi, P., Banbury, D.N. und Byrne, C. (1998). Patterned acquisition of skin barrier function during development. *Development* 125, 1541-1552
- Hosfield, C.M., Elce, J. S., Davies, P.L. und Jia, Z. (1999). Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca^{2+} dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation. *EMBO J.* 18: 6880-6889
- Kaplan, J.M., Kim, S., North, K.N., Rennke, I.L., Correia, L., Tong, H.Q., Mathis, B.J., Rodriguez-Perez, J.C., Allen, P.G., Beggs, A.H. und Pollak, M.R. (2000). Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat. Genet.* 24, 251-256
- Kozak, M. (1996). Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation. *Mamm. Genome* 7: 563-574
- Lee, H.A., Sorimachi, H., Jeong, S.-Y., Ishiura, S. und Suzuki, K. (1998). Molecular cloning and characterization of a novel tissue-specific calpain predominantly expressed in the digestive tract. *Biol. Chem.* 379, 175-183
- Lin, G.D., Chattopadhyay, D., Maki, M., Wang, K.K., Carson, M., Jin, L., Yuen, P.W., Takano, E., Hatanaka, M., DeLucas, L.J. und Narayana, S. V. (1997). Crystal structure of calcium bound domain VI of calpain at 1.9 Å resolution and its role in enzyme assembly, regulation, and inhibitor binding. *Nat. Struct. Biol.* 4: 539-547
- Matena, K., Boehm, T. und Dear, T.N. (1998). Genomic organization of mouse Capn5 and Capn6 genes confirms that they are a distinct calpain subfamily. *Genomics* 48: 117-120
- Mellgren, R.I. (1997). Evidence for participation of a calpainlike cysteine protease in cell cycle progression through late G1 phase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236: 555-558
- Richard, I., Broux, O., Allamand, V., Fougereousse, F., Chiannikulchai, N., Bourg, N., Brenguier, L., Devaud, C., Pasturaud, P., Roudaut, C., Hillaire, D., Passos-Bueno, M., Zatz, M., Tischfield, J.A., Fardeau, M., Jackson, C. E., Cohen, D. und Beckmann, J. S. (1995). Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2A. *Cell* 81: 27-40
- Sanibook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, pp. 7.43-7.45
- Schoenwaelder, S. M., Yuan, Y., Cooray, P., Salem, H.H. und Jackson, S. P. (1997). Calpain cleavage of focal adhesion

proteins regulates the cytoskeletal attachment of integrin α IIb β 3 (platelet glycoprotein IIb/IIIa) and the cellular retraction of fibrin clots. *J. Biol. Chem.* 272: 1694–1702

Sorimachi, H., Ishiura, S. und Suzuki, K. (1993). A novel tissuespecific calpain species expressed predominantly in the stomach comprises two alternative splicing products with and without Ca^{2+} binding domain. *J. Biol. Chem.* 268: 19476–19482

Sorimachi, H., Ishiura, S. und Suzuki, K. (1997). Structure and physiological function of calpains. *Biochem. J.* 328: 721–732.

Strobl, S., Fernandez-Catalan, C., Braun, M., Huber, R., Masumoto, H., Nakagawa, K., Ine, A., Sorimachi, H., Bourenkow, G., Bartunik, H., Suzuki, K. und Bode, W. (2000). The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 588–592

Thompson, J.D., Higgins, D.G. und Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22: 4673–4680

Van Eppen, W.J., Steen, R.G., Nguyen, H., Castle, A.B., Slonim, D.K., Ge, B., Nusbaum, C., Schuler, G.D., Lander, Es. und Hudson, T.J. (1999). Radiation hybrid map of the mouse genome. *Nat. Genet.* 22: 384–387

Wang, K.K. (2000). Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci.* 23: 20–26

Wang, K.K. und Yuen, P.W. (1997). Development and therapeutic potential of calpain inhibitors. *Adv. Pharmacol.* 37: 117–152

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> Capn12

<130> M/41195

<140>

<141>

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 720

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 1

Met Ala Ser Gly Asn Arg Lys Val Thr Ile Gln Leu Val Asp Asp Gly
 1 5 10 15

Ala Gly Thr Gly Ala Gly Gly Pro Gln Leu Phe Lys Gly Gln Asn Tyr
 20 25 30

Glu Ala Ile Arg Arg Ala Cys Leu Asp Ser Gly Ile Leu Phe Arg Asp
 35 40 45

Pro Cys Phe Pro Ala Gly Pro Asp Ala Leu Gly Tyr Asp Lys Leu Gly
 50 55 60

Pro Asp Ser Glu Lys Ala Lys Gly Val Glu Trp Lys Arg Pro His Glu
 65 70 75 80

Phe Cys Ala Glu Pro Gln Phe Ile Cys Glu Asp Met Ser Arg Thr Asp
 85 90 95

Val Cys Gln Gly Ser Leu Gly Asn Cys Trp Leu Leu Ala Ala Ala Ala
 100 105 110

Ser Leu Thr Leu Tyr Pro Arg Leu Leu Tyr Arg Val Val Pro Pro Gly
 115 120 125

Gln Gly Phe Gln Asp Gly Tyr Ala Gly Val Phe His Phe Gln Leu Trp
 130 135 140

Gln Phe Gly Arg Trp Val Asp Val Val Val Asp Asp Lys Leu Pro Val
 145 150 155 160

Arg Glu Gly Lys Leu Met Phe Val Arg Ser Glu Gln Arg Asn Glu Phe
 165 170 175

Trp Ala Pro Leu Leu Glu Lys Ala Tyr Ala Lys Leu His Gly Ser Tyr
 180 185 190

Glu Val Met Arg Gly Gly His Met Asn Glu Ala Phe Val Asp Phe Thr
 195 200 205

Gly Gly Val Gly Glu Val Leu Tyr Leu Arg Gln Asn Thr Pro Gly Val
 210 215 220

DE 100 31 932 A 1

Phe Ala Ala Leu Arg His Ala Leu Ala Lys Glu Ser Leu Val Gly Ala
 225 230 235 240
 5 Thr Ala Leu Ser Asp Arg Gly Glu Ile Arg Thr Asp Glu Gly Leu Val
 245 250 255
 Lys Gly His Ala Tyr Ser Val Thr Gly Thr His Lys Met Ser Leu Gly
 260 265 270
 10 Phe Thr Lys Val Arg Leu Leu Arg Leu Arg Asn Pro Trp Gly Arg Val
 275 280 285
 15 Glu Trp Ser Gly Pro Trp Ser Asp Ser Cys Pro Arg Trp Asp Met Leu
 290 295 300
 Pro Ser Glu Trp Arg Asp Ala Leu Leu Val Lys Lys Glu Asp Gly Glu
 305 310 315 320
 20 Phe Trp Met Glu Leu Gln Asp Phe Leu Thr His Phe Asn Thr Val Gln
 325 330 335
 25 Ile Cys Ser Leu Ser Pro Glu Val Leu Gly Pro Ser Pro Ala Gly Gly
 340 345 350
 Gly Trp His Ile His Ile Phe Gln Gly Arg Trp Val Arg Gly Phe Asn
 355 360 365
 30 Ser Gly Gly Ser Gln Pro Ser Ala Glu Asn Phe Trp Thr Asn Pro Gln
 370 375 380
 Phe Arg Leu Thr Leu Leu Glu Pro Asp Glu Glu Glu Asp Asp Asp Asp
 35 385 390 395 400
 Glu Glu Gly Pro Trp Gly Gly Trp Gly Ala Ala Gly Ala Arg Gly Pro
 405 410 415
 40 Ala Arg Gly Gly Arg Val Pro Lys Cys Thr Val Leu Leu Ser Leu Ile
 420 425 430
 Gln Arg Asn Arg Arg Cys Leu Arg Ala Lys Gly Leu Thr Tyr Leu Thr
 45 435 440 445
 Val Gly Phe His Val Phe Gln Ile Pro Glu Glu Leu Leu Asp Leu Trp
 450 455 460
 50 Asp Ser Pro Arg Ser Arg Ala Leu Leu Pro Gly Leu Leu Arg Ala Asp
 465 470 475 480
 Arg Ser Val Phe Cys Ala Arg Arg Asp Val Ser Arg Arg Cys Arg Leu
 485 490 495
 55 Pro Pro Gly His Tyr Leu Val Val Pro Ser Ala Ser Arg Val Gly Asp
 500 505 510
 60 Glu Ala Asp Phe Thr Leu Arg Ile Phe Ser Glu Arg Ser His Thr Ala
 515 520 525
 Val Glu Ile Asp Asp Val Ile Ser Ala Asp Leu Asp Ala Leu Gln Ala
 530 535 540
 65 Pro Tyr Lys Pro Leu Glu Leu Glu Leu Ala Gln Leu Phe Leu Glu Leu
 545 550 555 560

Ala Gly Glu Glu Glu Glu Leu Asn Ala Leu Gln Leu Gln Thr Leu Ile	565	570	575	
Ser Ile Ala Leu Glu Pro Ala Arg Ala Asn Thr Arg Thr Pro Gly Glu	580	585	590	5
Ile Gly Leu Arg Thr Cys Glu Gln Leu Val Gln Cys Phe Gly Arg Gly	595	600	605	10
Gln Arg Leu Ser Leu His His Phe Gln Glu Leu Trp Gly His Leu Met	610	615	620	
Ser Trp Gln Ala Thr Phe Asp Lys Phe Asp Glu Asp Ala Ser Gly Thr	625	630	635	15
Met Asn Ser Cys Glu Leu Arg Leu Ala Leu Thr Ala Ala Gly Phe His	645	650	655	20
Leu Asn Asn Gln Leu Thr Gln Ser Leu Thr Ser Arg Tyr Arg Asp Ser	660	665	670	
Arg Leu Arg Val Asp Phe Glu Arg Phe Val Gly Cys Ala Ala Arg Leu	675	680	685	25
Thr Cys Ile Phe Arg His Cys Cys Gln His Leu Asp Gly Gly Glu Gly	690	695	700	30
Val Val Cys Leu Thr His Lys Gln Trp Ser Glu Val Ala Thr Phe Ser	705	710	715	35
				40
<210> 2				
<211> 518				
<212> PRT				
<213> Mouse				
<400> 2				45
Met Ala Ser Gly Asn Arg Lys Val Thr Ile Gln Leu Val Asp Asp Gly	1	5	10	15
Ala Gly Thr Gly Ala Gly Gly Pro Gln Leu Phe Lys Gly Gln Asn Tyr	20	25	30	50
Glu Ala Ile Arg Arg Ala Cys Leu Asp Ser Gly Ile Leu Phe Arg Asp	35	40	45	
Pro Cys Phe Pro Ala Gly Pro Asp Ala Leu Gly Tyr Asp Lys Leu Gly	50	55	60	55
Pro Asp Ser Glu Lys Ala Lys Gly Val Glu Trp Lys Arg Pro His Glu	65	70	75	60
Phe Cys Ala Glu Pro Gln Phe Ile Cys Glu Asp Met Ser Arg Thr Asp	85	90	95	
Val Cys Gln Gly Ser Leu Gly Asn Cys Trp Leu Leu Ala Ala Ala Ala	100	105	110	65
Ser Leu Thr Leu Tyr Pro Arg Leu Leu Tyr Arg Val Val Pro Pro Gly				

	115	120	125
5	Gln Gly Phe Gln Asp Gly Tyr Ala Gly Val Phe His Phe Gln Leu Trp 130 135 140		
	Gln Phe Gly Arg Trp Val Asp Val Val Val Asp Asp Lys Leu Pro Val 145 150 155 160		
10	Arg Glu Gly Lys Leu Met Phe Val Arg Ser Glu Gln Arg Asn Glu Phe 165 170 175		
15	Trp Ala Pro Leu Leu Glu Lys Ala Tyr Ala Lys Leu His Gly Ser Tyr 180 185 190		
	Glu Val Met Arg Gly Gly His Met Asn Glu Ala Phe Val Asp Phe Thr 195 200 205		
20	Gly Gly Val Gly Glu Val Leu Tyr Leu Arg Gln Asn Thr Pro Gly Val 210 215 220		
25	Phe Ala Ala Leu Arg His Ala Leu Ala Lys Glu Ser Leu Val Gly Ala 225 230 235 240		
	Thr Ala Leu Ser Asp Arg Gly Glu Ile Arg Thr Asp Glu Gly Leu Val 245 250 255		
30	Lys Gly His Ala Tyr Ser Val Thr Gly Thr His Lys Met Ser Leu Gly 260 265 270		
	Phe Thr Lys Val Arg Leu Leu Arg Leu Arg Asn Pro Trp Gly Arg Val 275 280 285		
35	Glu Trp Ser Gly Pro Trp Ser Asp Ser Cys Pro Arg Trp Asp Met Leu 290 295 300		
40	Pro Ser Glu Trp Arg Asp Ala Leu Leu Val Lys Lys Glu Asp Gly Glu 305 310 315 320		
	Phe Trp Met Glu Leu Gln Asp Phe Leu Thr His Phe Asn Thr Val Gln 325 330 335		
45	Ile Cys Ser Leu Ser Pro Glu Val Leu Gly Pro Ser Pro Ala Gly Gly 340 345 350		
50	Gly Trp His Ile His Ile Phe Gln Gly Arg Trp Val Arg Gly Phe Asn 355 360 365		
	Ser Gly Gly Ser Gln Pro Ser Ala Glu Asn Phe Trp Thr Asn Pro Gln 370 375 380		
55	Phe Arg Leu Thr Leu Leu Glu Pro Asp Glu Glu Glu Asp Asp Asp Asp 385 390 395 400		
60	Glu Glu Gly Pro Trp Gly Gly Trp Gly Ala Ala Gly Ala Arg Gly Pro 405 410 415		
	Ala Arg Gly Gly Arg Val Pro Lys Cys Thr Val Leu Leu Ser Leu Ile 420 425 430		
65	Gln Arg Asn Arg Arg Cys Leu Arg Ala Lys Gly Leu Thr Tyr Leu Thr 435 440 445		
	Val Gly Phe His Val Phe Gln Ile Pro Glu Glu Pro Arg Ala Leu Ala		

DE 100 31 932 A 1

450	455	460	
Gly Thr Ala Ala Arg Arg Pro Leu Gly Phe Leu Arg Pro Pro Arg Arg			
465	470	475	480
Glu Pro Ser Leu Ser Pro Ala Ala Trp Pro Leu Pro Gly His Ile Cys			
	485	490	495
His Ala Phe Asp Asx Cys His Ala Phe Leu Cys His Phe Gly Thr Gln			
	500	505	510
Arg Leu Ala Arg Arg Arg			
	515		
<210> 3			
<211> 462			
<212> PRT			
<213> Mouse			
<400> 3			
Met Ala Ser Gly Asn Arg Lys Val Thr Ile Gln Leu Val Asp Asp Gly			
1	5	10	15
Ala Gly Thr Gly Ala Gly Gly Pro Gln Leu Phe Lys Gly Gln Asn Tyr			
	20	25	30
Glu Ala Ile Arg Arg Ala Cys Leu Asp Ser Gly Ile Leu Phe Arg Asp			
	35	40	45
Pro Cys Phe Pro Ala Gly Pro Asp Ala Leu Gly Tyr Asp Lys Leu Gly			
	50	55	60
Pro Asp Ser Glu Lys Ala Lys Gly Val Glu Trp Lys Arg Pro His Glu			
	65	70	75
Phe Cys Ala Glu Pro Gln Phe Ile Cys Glu Asp Met Ser Arg Thr Asp			
	85	90	95
Val Cys Gln Gly Ser Leu Gly Asn Cys Trp Leu Leu Ala Ala Ala Ala			
	100	105	110
Ser Leu Thr Leu Tyr Pro Arg Leu Leu Tyr Arg Val Val Pro Pro Gly			
	115	120	125
Gln Gly Phe Gln Asp Gly Tyr Ala Gly Val Phe His Phe Gln Leu Trp			
	130	135	140
Gln Phe Gly Arg Trp Val Asp Val Val Val Asp Asp Lys Leu Pro Val			
	145	150	155
Arg Glu Gly Lys Leu Met Phe Val Arg Ser Glu Gln Arg Asn Glu Phe			
	165	170	175
Trp Ala Pro Leu Leu Glu Lys Ala Tyr Ala Lys Leu His Gly Ser Tyr			
	180	185	190
Glu Val Met Arg Gly Gly His Met Asn Glu Ala Phe Val Asp Phe Thr			
	195	200	205
Gly Gly Val Gly Glu Val Leu Tyr Leu Arg Gln Asn Thr Pro Gly Val			
	210	215	220

Phe Ala Ala Leu Arg His Ala Leu Ala Lys Glu Ser Leu Val Gly Ala
 225 230 235 240
 5 Thr Ala Leu Ser Asp Arg Gly Glu Ile Arg Thr Asp Glu Gly Leu Val
 245 250 255
 Lys Gly His Ala Tyr Ser Val Thr Gly Thr His Lys Met Ser Leu Gly
 260 265 270
 10 Phe Thr Lys Val Arg Leu Leu Arg Leu Arg Asn Pro Trp Gly Arg Val
 275 280 285
 15 Glu Trp Ser Gly Pro Trp Ser Asp Ser Cys Pro Arg Trp Asp Met Leu
 290 295 300
 Pro Ser Glu Trp Arg Asp Ala Leu Leu Val Lys Lys Glu Asp Gly Glu
 305 310 315 320
 20 Phe Trp Met Glu Leu Gln Asp Phe Leu Thr His Phe Asn Thr Val Gln
 325 330 335
 25 Ile Cys Ser Leu Ser Pro Glu Val Leu Gly Pro Ser Pro Ala Gly Gly
 340 345 350
 Gly Trp His Ile His Ile Phe Gln Gly Arg Trp Val Arg Gly Phe Asn
 355 360 365
 30 Ser Gly Gly Ser Gln Pro Ser Ala Glu Asn Phe Trp Thr Asn Pro Gln
 370 375 380
 Phe Arg Leu Thr Leu Leu Glu Pro Asp Glu Glu Glu Asp Asp Asp Asp
 385 390 395 400
 Glu Glu Gly Pro Trp Gly Gly Trp Gly Ala Ala Gly Ala Arg Gly Pro
 405 410 415
 40 Ala Arg Gly Gly Arg Val Pro Lys Cys Thr Val Leu Leu Ser Leu Ile
 420 425 430
 Gln Arg Asn Arg Arg Cys Leu Arg Ala Lys Gly Leu Thr Tyr Leu Thr
 435 440 445
 45 Val Gly Phe His Val Phe Gln Ile Pro Glu Glu Gly Asp Arg
 450 455 460
 50
 <210> 4
 <211> 447
 <212> PRT
 55 <213> Mouse
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 Capn12-Primer
 60
 <400> 4
 Met Ala Ser Gly Asn Arg Lys Val Thr Ile Gln Leu Val Asp Asp Gly
 1 5 10 15
 65 Ala Gly Thr Gly Ala Gly Gly Pro Gln Leu Phe Lys Gly Gln Asn Tyr
 20 25 30

Glu Ala Ile Arg Arg Ala Cys Leu Asp Ser Gly Ile Leu Phe Arg Asp	35	40	45	
Pro Cys Phe Pro Ala Gly Pro Asp Ala Leu Gly Tyr Asp Lys Leu Gly	50	55	60	5
Pro Asp Ser Glu Lys Ala Lys Gly Val Glu Trp Lys Arg Pro His Glu	65	70	75	80
Phe Cys Ala Glu Pro Gln Phe Ile Cys Glu Asp Met Ser Arg Thr Asp	85	90	95	10
Val Cys Gln Gly Ser Leu Gly Asn Cys Trp Leu Leu Ala Ala Ala Ala	100	105	110	15
Ser Leu Thr Leu Tyr Pro Arg Leu Leu Tyr Arg Val Val Pro Pro Gly	115	120	125	20
Gln Gly Phe Gln Asp Gly Tyr Ala Gly Val Phe His Phe Gln Leu Trp	130	135	140	25
Gln Phe Gly Arg Trp Val Asp Val Val Val Asp Asp Lys Leu Pro Val	145	150	155	30
Arg Glu Gly Lys Leu Met Phe Val Arg Ser Glu Gln Arg Asn Glu Phe	165	170	175	35
Trp Ala Pro Leu Leu Glu Lys Ala Tyr Ala Lys Leu His Gly Ser Tyr	180	185	190	40
Glu Val Met Arg Gly Gly His Met Asn Glu Ala Phe Val Asp Phe Thr	195	200	205	45
Gly Gly Val Gly Glu Val Leu Tyr Leu Arg Gln Asn Thr Pro Gly Val	210	215	220	50
Phe Ala Ala Leu Arg His Ala Leu Ala Lys Glu Ser Leu Val Gly Ala	225	230	235	55
Thr Ala Leu Ser Asp Arg Gly Glu Ile Arg Thr Asp Glu Gly Leu Val	245	250	255	60
Lys Gly His Ala Tyr Ser Val Thr Gly Thr His Lys Met Ser Leu Gly	260	265	270	65
Phe Thr Lys Val Arg Leu Leu Arg Leu Arg Asn Pro Trp Gly Arg Val	275	280	285	
Glu Trp Ser Gly Pro Trp Ser Asp Ser Cys Pro Arg Trp Asp Met Leu	290	295	300	
Pro Ser Glu Trp Arg Asp Ala Leu Leu Val Lys Lys Glu Asp Gly Glu	305	310	315	
Phe Trp Met Glu Leu Gln Asp Phe Leu Thr His Phe Asn Thr Val Gln	325	330	335	
Ile Cys Ser Leu Ser Pro Thr Pro Gly Trp Arg Arg Gly Gly Arg Leu	340	345	350	
Pro Asp Pro Gln Thr Val Val Gly Gly Gly Tyr Leu Leu Ile Gly Leu	355	360	365	

Lys Leu Arg Glu Val Thr Leu Leu Pro Asp Ser Leu Gln Arg Trp Trp
 370 375 380

5 Leu Cys Asn Pro Gly Arg Pro His Lys Cys Trp Asp Tyr Glu Leu Glu
 385 390 395 400

Pro Ser Gln Thr Glu Leu Pro Pro Phe Leu Leu Lys Pro Leu His Val
 405 410 415

10 Ser Pro Cys Leu Glu Arg Gly Thr Thr Pro Thr Gln Ala Leu Gly Trp
 420 425 430

15 Trp Ala Leu Pro Ala Pro Trp Gly Met Asn Arg Asp Ala Gly Arg
 435 440 445

20 <210> 5
 <211> 2498
 <212> DNA
 <213> Mouse

25 <400> 5

ggagccacgc ccccatgac tcaggaggtt aaagggcttg ggtccatctg tgtgcccaga 60
 gtgtccgaat ggcgagtggc aacaggaagg tcaccatcca gctggtggac gacggggccg 120
 ggactggagc tgggggcccc cagctcttta aaggccagaa ctacgaagcc atccgaagag 180
 30 cttgcctgga ttccgggata ctgtttcgtg acccttgctt tcctgctggc cctgatgccc 240
 ttggctatga caagctggga cctgactcag agaaggccaa aggggtggaa tggagaggc 300
 cccatgagtt ttgtgctgag cccagttca tctgtgaaga catgagcaga acagatgtgt 360
 gccagggaag cttgggaaac tgetggcttc ttgcagctgc tgccctccctc acactctacc 420
 ccaggtcct gtaccgggtg gtccccctg gacaagggtt ccaagatggc tacgcggggg 480
 35 tcttccattt tcagctatgg cagtttgccg gctgggtgga tgtggtgga gacgacaaac 540
 tgccctgtgc tgaggggaag ctgatgttcg tgcgctcaga acaaaggaac gatttctggg 600
 cccctctgct ggaaaaggcc tatgccaaag tccatggctc ctacgagga atgcgaggag 660
 gtcacatgaa cgaggctttt gtggacttta caggaggcgt ggggtgaggtt ctctacttga 720
 gacaaaacac tccaggtgtc tttgctgccc ttgccacgc attggccaag gattcccttg 780
 40 tgggtgctac tgccctgagt gatcgggggtg agatccgcac agatgaaggg ctggtgaagg 840
 gacatgctta ttctgtcaca ggcacgcaca agatgtctct gggcttcacc aagggtgcggc 900
 tgctgcccgt gaggaacccc tggggcccg gtagtggtc cgggcccctg agtgacagct 960
 gccacgctg ggacatgtc cttctgagt ggcgagatgc cctgcttggtg aaaaaggagg 1020
 45 atggcgagtt ctggatggag cttcaagact ttctcacgca cttcaacaca gtgcagattt 1080
 gttcactgag tcctgaggtg ttgggcccc gcccgtgctg cggcggtg catatccaca 1140
 tcttccagg ccgctgggtg cgaggcttca actccggtg gagtcagccc agcgtgaaa 1200
 acttctggac caacccccag ttccggctga cactgctgga gcctgatgag gaagaggatg 1260
 acgatgatga agagggaccc tggggaggct ggggagcggc agggggcccgg gggccggcga 1320
 50 gaggaggccg agtccccaa tgacaggtcc tgttgtcact catccagcgc aaccgcccgt 1380
 gtctgagggc caagggcctc acttacctca ctgtgggctt ccacgtgttc cagattccgg 1440
 aggagctgct ggacctctgg gactccccgc gcagccgcgc gctcttgccg ggactgctgc 1500
 gcgccgaccg ctcggttttc tgcgccgcc gcgacgtgag ccgtcgtgt cgcctgcccgc 1560
 ctggccacta cctggtgga cccagcgcct cgcgcgtagg cgatgaagcc gacttactc 1620
 55 tgcgcatctt ctcgagcgc agccacaccg cagtggagat cgatgacgtg atcagcgcag 1680
 acctggacgc cctccaggcc ccctacaagc ccctggagct ggagttggca cagctatttt 1740
 tggagctggc tggagaggag gaggaactca acgctcttca gctgcagacc ttaataagca 1800
 ttgctctgga acctgcgagg gccaacacca ggacccttg agagattggg cttaggacct 1860
 60 gcgaacagct tgtgcagtgt tttgggcgtg ggcaaagact gtccctacac cacttccagg 1920
 agctctgggg ccatctcatg tcatggcagg ccacatttga caagtttgat gaagatgcct 1980
 ctgggacaat gaactcctgt gaactgaggc tggcactgac tgctgcaggc ttccacctca 2040
 acaaccagct gaccagtc ctcactagcc gctaccggga cagccggctc cgtgtggact 2100
 tcgagcgctt cgtgggctgt gcagcccggc tcacctgcat ctccgccac tgctgccaac 2160
 65 acctggatgg cggcgagggg gtcgtctgcc tgaccacaa acagtggctc gaggtggcta 2220
 ccttctcata ggtttgaagc tgagggaggt caccctgctg cccgactcac tgtcaciaag 2280
 gtggtggcta tgtaaccctg gccggcctca caagtgtg gattacgagc tggagccatc 2340

ccaaacagaa ctgccaccct tccttttgaa gccttttcat gtcagtcctt gcttagagag 2400
 gggcacaacc cccacacagg cactgggctg gtgggcactg ccagctcctt ggggcatgaa 2460
 cagagatgca gggagaagat gacaccagag tcctttctt 2498

<210> 6
 <211> 2469
 <212> DNA
 <213> Mouse

<400> 6
 ggagccacgc ccccatgac tcaggagggt aaagggcttg ggtccatctg tgtgccaga 60
 gtgtccgaat ggcgagtggc aacaggaagg tcaccatcca gctggtggac gacggggccg 120
 ggactggagc tgggggcccc cagctcttta aaggccagaa ctacgaagcc atccgaagag 180
 cttgcctgga ttccgggac cgtgttcgtg acccttgctt tcctgctggc cctgatgcc 240
 ttggctatga caagctggga cctgactcag agaaggccaa aggggtggaa tggaaaggcg 300
 cccatgagtt ttgtgctgag cccagttca tctgtgaaga catgagcaga acagatgtgt 360
 gccagggaag cttgggaaac tgcctggctt ttgcagctgc tgcctccctc acactctacc 420
 ccaggctcct gtaccgggtg gtccccctg gacaagggtt ccaagatggc tacgcggggg 480
 tcttccattt tcagctatgg cagtttgcc gctgggtgga tgtggtgga gacgacaaac 540
 tgctgtgctg tgaggggaag ctgatgttcg tgcgtcaga acaaaggaaac gagttctggg 600
 cccctctgct ggaaaaggcc tatgccaaag tccatggctc ctacgaggtg atgcgaggag 660
 gtcacatgaa cgaggctttt gtggacttta caggaggcgt gggtagagtt ctctacttga 720
 gacaaaacac tccagggtgc ttgtgtccc ttgcacgc attggccaag ggtcccttg 780
 tgggtgctac tgcctgagt gatcgggtg agatccgcac agatgaaggg ctggtgaagg 840
 gacatgctta ttctgtcaca ggcacgcaca agatgtctct gggcttcacc aaggtgcggc 900
 tgctgcggct gaggaacccc tggggcccg tggagtggc cgggcccttg agtgacagct 960
 gccacgctg ggacatgctc cttctgagt ggcgagatgc cctgcttgtg aaaaaggagg 1020
 atggcgagtt ctggatggag cttcaagact ttctcacgca cttcaacaca gtgcagattt 1080
 gttcactgag tcctgaggtg ttgggcccc gacctgctgg cggcggtg catatccaca 1140
 tcttccaggg ccgctgggtg cgaggcttca actccgggtg gactcagccc agcgtgaaa 1200
 acttctggac caacccccag ttccggctga cactgtgga gcctgatgag gaagaggatg 1260
 acgatgatga agagggaccc tggggaggct ggggagcggc aggggcccgg ggcccggcga 1320
 gaggaggccg agtccccaag tgcacggtcc tgtgtcact catccagcgc aaccgcccgt 1380
 gtctgagggc caagggcctc acttacctca ctgtgggctt ccacgtgttc cagattccgg 1440
 aggagcccg cgctcttgcc gggactgctg cgcgcgacc gctcggttt ctgcgccgc 1500
 cgcgacgtga gccgtcgtg tcgctgccc cctggccact acctggtgtg acccagcgc 1560
 tcgcgctgag gcgatgaagc cgacttact ctgcgcact tctcggagcg cagccacacc 1620
 gcagtggaga tcgatgacgt gatcagcga gacctggacg cctccaggc cccctacaag 1680
 cccctggagc tggagttggc acagctattt ttggagctgg ctggagagga ggaggaactc 1740
 aacgtcttc agctgcagac cttaataagc attgctctgg aacctgcgag ggccaacacc 1800
 aggacccctg gagagattgg gcttaggacc tgcgaacagc ttgtgcagtg ttttggcg 1860
 gggcaaagac tgtccctaca ccacttccag gagctctggg gccatctcat gtcattggcag 1920
 gccacatttg acaagtttga tgaagatgcc tctgggacaa tgaactcctg tgaactgagg 1980
 ctggcactga ctgctgcagg ctccacctc aacaaccagc tgacccagtc cctcactagc 2040
 cgctaccggg acagccggct ccgtgtggac ttcgagcgt tctgtggctg tgcagcccgc 2100
 ctcacctgca tcttccgcca ctgctgcaa cacctggatg gcgagcagg ggtcgtctgc 2160
 ctgacccaca aacagtggc ggaggtgct accttctcat aggtttgaag ctgagggagg 2220
 tcacctgct gcccgactca ctgtcacaaa ggtggtggct atgtaaccct ggccggcctc 2280
 acaagtgctg ggattacgag ctggagccat cccaaacaga actgccaccc ttccttttga 2340
 agcctcttca tgtcagtcct tgcctagaga ggggcacaac cccacacag gcactgggct 2400
 ggtgggcact gccagctcct tggggcatga acagagatgc agggagaaga tgacaccaga 2460
 gtccttctt 2469

<210> 7
 <211> 2289
 <212> DNA
 <213> Mouse

<400> 7
 ggagccacgc ccccatgac tcaggagggt aaagggcttg ggtccatctg tgtgccaga 60
 gtgtccgaat ggcgagtggc aacaggaagg tcaccatcca gctggtggac gacggggccg 120

ggactggagc tgggggccc cagctcttta aaggccagaa ctacgaagcc atccgaagag 180
 cttgcctgga ttccgggata ctgtttcgtg acccttgctt tcctgctggc cctgatgcc 240
 ttggctatga caagctggga cctgactcag agaaggccaa aggggtggaa tggaaaggcc 300
 5 cccatgagtt ttgtgctgag cccagttca tctgtgaaga catgagcaga acagatgtgt 360
 gccagggaag cttgggaaac tgcctgcttc ttgcagctgc tgcctccctc acactctacc 420
 ccaggctcct gtaccgggtg gtccccctg gacaagggtt ccaagatggc tacgcggggg 480
 tcttccattt tcagctatgg cagtttgccc gctgggtgga tgtggtgga gacgacaaac 540
 tgcctgtgcg tgaggggaaag ctgatgttcg tgcgctcaga acaaaggaac gagttctggg 600
 10 cccctctgct ggaaaaggcc tatgccaagc tccatggctc ctacgagga atgcgaggag 660
 gtcacatgaa cgaggctttt gtggacttta caggaggcgt gggtagggtt ctctacttga 720
 gacaaaacac tccagggtgc tttgctgccc ttgcgccagc attggccaag gaggcccttg 780
 tgggtgctac tgcctgagt gatcgggggtg agatccgcac agatgaaggg ctggtgaagg 840
 15 gacatgctta ttctgtcaca ggcacgcaca agatgtctct gggcttcacc aagggtgcggc 900
 tgctgcggct gaggaacccc tggggccgctg tggagtgtgc cgggcccttg agtgacagct 960
 gccacgctg ggacatgctc ccttctgagt ggcgagatgc cctgcttggt aaaaaggagg 1020
 atggcgagtt ctggatggag cttcaagact ttctcacgca cttcaacaca gtgcagattt 1080
 gttcactgag tcctgagggtg ttgggcccc aacctgctgg cggcggttg catatccaca 1140
 20 tcttccaggg ccgctgggtg cgaggcttca actccggtgg gaggcagccc agcgtgaaa 1200
 acttctggac caacccccag ttccggctga cactgctgga gcctgatgag gaagaggatg 1260
 acgatgatga agagggaccc tggggaggct ggggagcggc aggggcccgg ggcccggcga 1320
 gaggaggccg agtccccaa tgacacggctc catccagcgc aaccgcccgt 1380
 gtctgaggcg caagggcctc acttacctca ctgtgggctt ccacgtgttc cagattccgg 1440
 25 aggagggaga tcgatgacgt gatcagcgca gacctggacg ccctccaggc cccctacaag 1500
 cccctggagc tggagtggc acagctattt ttggagctgg ctggagagga ggaggaaactc 1560
 aacgctcttc agctgcagac ctttaataagc attgctctgg aacctgcgag ggccaacacc 1620
 aggacccctg gagagattgg gcttaggacc tgcaaacagc ttgtgcagt ttttgggctg 1680
 30 gggcaaagac tgctccctaca ccacttccag gagctctggg gccatctcat gtcattggcag 1740
 gccacatttg acaagtttga tgaagatgcc tctgggacaa tgaactcctg tgaactgagg 1800
 ctggcactga ctgctgcagg cttccacctc aacaaccagc tgacccagtc cctcactagc 1860
 cgctaccggg acagccggct ccgtgtggac ttcgagcgtc tcgtgggctg tgcagcccgg 1920
 ctcacctgca tcttcgccca ctgctgccc aacctggatg gcggcgaggg ggtcgtctgc 1980
 35 ctgaccaca aacagtggct ggaggtggct accttctcat aggtttgaag ctgaggaggg 2040
 teacctgct gcccgactca ctgtcaca aa ggtggtggct atgtaacctt ggccggcctc 2100
 acaagtgtcg ggattacgag ctggagccat cccaaacaga actgccacc ttccttttga 2160
 agcctcttca tgcagtcctc tgcttagaga ggggcacaa cccacacag gcactgggct 2220
 40 ggtgggcact gccagctcct tggggcatga acagagatgc agggagaaga tgacaccaga 2280
 gtccttctt

<210> 8

<211> 13116

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 8

50 tggctcctcct aggcctgccc accttttgtg tgcctcaggt cattaagctg ctaaactcgc 60
 cacaactgag ggctccgtgc cccaggaggg aaaccactga agaagcgtcc ctgctccttc 120
 gcaccccaaa ccatcaatta atattaacaa gggagaatgc tcctcgatgc ctaaagacc 180
 ccaacagggt acaaatggag caggagccac gccccccatg actcaggagg ttaaagggt 240
 tgggtccatc tgtgtgcccc gagtgtccga atggcgagt gcaacaggaa ggtcaccatc 300
 55 cagctgggtg acgacggggc cgggactgga gctgggggccc cacagctctt taaaggccag 360
 aactacgaag ccatccgaag agcttgctg gattccggga tcctgtttcg tgacccttgc 420
 tttcctgctg gccctgatgc ccttggctat gacaagctgg gacctgactc agagaaggcc 480
 aaaggggtgg aatggaagag gccccatgta aagtggggct gggctgggac ctgggtctga 540
 60 tgggggaggg ccaggacaag gactcctggg tctgagggag gaggaccagg tcctggactc 600
 ttggatctga gggaggaggg ccagggcctg ggtctgaggg aggaggacca gggcctgaac 660
 tcttgggtct gagggaggag gaccagggcc tgaactcttg ggtctgaggg aggagggcca 720
 gggcctgggt ctgaggggag aggaccaggg cctgaactct tgggtctgag ggaggacgac 780
 cagggcctgg actcttgggt ctgaggggag agggccagag tcttagcctg agggatcagg 840
 65 gccaggacat gaacccttga gtgtaagaga gacaggctga ggtctagaat cctggttctt 900
 aggaaaaggg agtgggggat aagagcagac tcagccacgg gattcaaggg gatccaggaa 960
 ggcaaacctc caccacaga ctttcccaag gttggaggcc ctactacct gggtactggt 1020
 gtcagggtc aggcctctga cttctccatt gttccagcct tcccttacct ggcttctctg 1080

gaaccttaat	cttccaggag	ttttgtgctg	agccccagtt	catctgtgaa	gacatgagca	1140
gaacagatgt	gtgccaggga	agcttggttg	agcccccttg	tgactgtctg	gagcccctag	1200
accaggact	tgaacagctc	ctctcctctg	tctcctgtcc	ccatggcttc	tttcttcagt	1260
ctgctggctc	ctgggtccact	cgtacctaat	ctgagcctct	ttcctcctcc	tcctaggaaa	1320
ctgctggctt	cttgagctg	ctgcctccct	cacactctac	cccaggctcc	tgtaccgggt	1380
ggccccccct	ggacaagggt	tccaagatgg	ctacgcgggg	gtcttccatt	ttcaggtaga	1440
gtccagttcc	ttgctctgtg	cctcaatttc	ccccgtggta	gcatgatgac	ataggcttca	1500
cagttaccat	tatgtcccta	ccccagcgca	ggaggactgg	aattccagaa	cttgggaagc	1560
agaaggcaaa	agcgggggtt	ggaggtagga	atcaggcagg	gtctggaagc	tgagccgctc	1620
ctgcctgtg	ttttgttttg	ttttgttttg	ttttgttttg	cttcaccagc	tatggcagtt	1680
tggccgctgg	gtggatgtgg	tggtagacga	caaactgcct	gtgcgtgagg	ggaagctgat	1740
gttcgtgcgc	tcagaacaaa	ggaacgagtt	ctgggcccct	ctgctggaaa	aggcctatgc	1800
caagtaagga	ctccgcccc	tcccaaagcc	ccagccctcc	cagctgcagc	cccaagaaca	1860
tgcccaagcc	acgtggagta	ctgacatcac	atcgggggtc	ctccagacac	ccaacctagg	1920
acctgaacc	cagtcatagc	ccgccatagc	cctagtatca	tggcactctc	ctggaagaac	1980
cttcattttt	tggatattta	ttgagaaaag	acctcataca	acctagcttg	cccagggaatt	2040
agctatgtag	ccaaatgaga	ccttgaaactg	agggttttgc	ctccatctca	gaagtgtctg	2100
ggttccaggt	gtgtgctacc	accccagggt	tatgcggtgc	tgggtttgaa	cccagggtct	2160
catgtatgct	tggtgaagccc	tctaccaact	gagctacatc	cccaaccttt	atccattcag	2220
ttattgtctt	gttatgtagg	ccaggttggc	ctcaaactca	taatectect	tactggggcc	2280
cttgtgtgca	tagaatatag	gcatgcacca	caacccatgg	ctaaagttag	gaaggagtg	2340
tgtgtgagct	ggggatggaa	cccacgatct	gtgcatgctg	agccacatcc	cagctcctca	2400
ctgggggatt	ctaggcaggg	gctctaccac	tgagccacgc	ccccagctcc	tactgggggg	2460
attctaggca	ggggctctac	cactgagcca	cgccccccagc	ccctcactgg	gggattctag	2520
gcaggggctc	taccactgag	ccacaccccc	agccccctcac	tgggggattc	taggcagggg	2580
ctctaccact	gagccacgcc	cccagcccct	cactggggga	ttctaggcag	gggctctacc	2640
actgagccac	gccccagccc	cctcactggg	ggagtctagg	caggggctct	accactgagc	2700
cacacccccca	gccccctact	aggggattct	aggcaggggc	tctaccactg	agccacgccc	2760
ccagccccctc	actgggggag	tctaggcagg	ggctctacca	ctgagccaca	ccccaaagccc	2820
ctcactaggg	gattctaggc	aggggctcta	ccactgagcc	acgccccag	ccctcactg	2880
ggggattcta	ggcaggggct	ctaccactga	gccatgcccc	cagccccctca	ctgggggatt	2940
ctaggcaggg	gctctaccac	tgagccacgc	ccccagcccc	ttactggggg	attctaggca	3000
ggggctctac	cactgagcca	tgccccccagc	ccctcactgg	gggattctag	gcaggggctc	3060
taccactgag	ccacgcccc	agccccctcac	tgggggattc	taggcagggg	ctctaccact	3120
gagccacgcc	ccagccccctc	actggggaat	tctaggcaga	ggctctacca	ctgaagcata	3180
aggttcagcc	tgtgaatctt	ctaactctgt	ttgtttgctt	gtttgtttgt	ttatttatgg	3240
ttcttcaaga	caggatttca	ctgtgtaact	tggctgtcct	ggaactcact	ctgtagagca	3300
ggctgacctc	agactcatag	agatctgcct	gcttttgctt	cctgagtgtc	gggattaaag	3360
gcatacacca	ctaccagca	gaattttcaa	atcttaaagg	cctcctctct	tctcttctct	3420
tctcttctct	tctcttctct	tctcttctct	tctcttctct	tctcttctct	cttcttctct	3480
tttttttttt	ttgtggaat	gacattttcc	acaaacattc	taagaatccc	actgatactc	3540
atatttccca	aggatcctga	aatcccatca	tctatcagaa	cctggatttg	ccaaatctta	3600
ttccctcaag	ggcctttaac	ctcacgccat	ctctcatggg	ccttgagac	atcggcagcc	3660
catcctttat	cataggatta	ggctaccgtg	cgttggaagg	cctgacaagt	ccccataggc	3720
atcgccctta	caggctccca	gagcctcaaa	ggttgaggga	gagttgagaa	ttctgggtgca	3780
gctcttccat	ggcttccaga	ctgcacagtt	tcatggaccc	tagagatgag	aggcctagca	3840
tgtgtcagat	gagttcccca	cctcatctct	gaatagttca	gggattgagc	ctactcctat	3900
tatcacagta	gtactaagtg	tactgaggca	ggaggattgc	aagtttgagg	gcagactgag	3960
atgcatagca	ataccatgtc	taaaacaaac	acaaacaccc	aattagctga	gcacttatag	4020
aacaactttg	tctctagtac	tctgagagca	gaggcagggt	gatctctggg	actctgagac	4080
aaatgtggtc	tacagagtga	gttcttggtc	agtcaaagct	tggctctcaa	gacaagaggg	4140
agggctgggg	gctgggggtg	ggaatctgta	gagatggctc	agtgttaaga	gcactgggtg	4200
ctcttccaga	agacctgact	tttattccca	gtcacgacta	tgtgtaactt	cagtaccagg	4260
gatctgaggc	ttccatggac	actgcacaca	tgacatgtgg	tgacagaca	tacatgcagg	4320
caaaacacat	acatatagaa	attacataca	catacacaca	attggggaa	aggtcctgga	4380
gaccttatt	ctgatagagc	tctgccccaa	gatgttctgt	accttagacc	tacttctacc	4440
tgctccaaca	ggctccatgg	ctccta'cgag	gtaatgcgag	gaggtcacat	gaacgaggct	4500
tttgtggact	ttacaggagg	cgtgggtgag	gttctctact	tgagacaaaa	cactccaggt	4560
gtctttgctg	cccttcgcca	cgcattggcc	aaggagtccc	ttgtgggtgc	tactgccctg	4620
gtgagagctg	ggctcccctg	tggaacctcca	ctagaccaac	ttagtcaagg	atgaggtggg	4680
aggggagcct	tagcatccag	tgtctttctt	accttctgcg	gttgactccc	cctctcccc	4740
cagatcctca	atgatagatt	ctaggccaga	gttctacata	taagctacat	ccctcccccc	4800
acctccattt	ttacttttca	tttcgaggga	aagtctaagt	tacctacacg	ggccttgaac	4860

atgtcacgca tcagccttct gtgttgctcg aatcccaggc ctgtagtgca gagtccgggt 4920
 tcccccatc tcctatctgt cactccaatt gctctcccca gctctctctc tgagtcctt 4980
 ggcattttat gctgctttga gagtccggg attggaagca tgaggatggg ttggggggct 5040
 5 ggggagagat gcttctacct cccaccgag gctcacaatc ttcgcctcct ccagagtgat 5100
 cggggtgaga tccgcacaga tgaagggtg gtgaaggac atgcttattc tgtcacaggc 5160
 acgcacaagg tgagacgctc cataggtgga ctgggctaac cctaccctct gtaacgatgc 5220
 cctcacacc accctcactg atgactttgt cttcagatgt ctctgggctt caccaagggtg 5280
 cggtgctgc ggctgaggaa cccctggggc cgcgtggagt ggtccggggc ctggagtgc 5340
 10 aggtaggatg ggcttggggg ggggtggggc gtggtcaggg gcgtggctcc acatgtcttc 5400
 ctctcacatt ggtctcctca gctgccacg ctgggacatg ctccctctg agtggcgaga 5460
 tgccctgctt gtgaaaaagg aggatggcga gttctgggtga gttcttaggg acccactcta 5520
 ccggtgggag gtccgctggg acaggagcct tagaacgcag ggccagaaag gacacagaga 5580
 15 aactcatggg atggatgggt catgttgca agcaatggc cctatcagct gtgatgtggg 5640
 aatctaaatc ttttttttg caaagttaga gcagaagcag taagatcagg actataaagg 5700
 gcattgtttt cagagggaga acactgaaat taggttagct taaaactcac tatatagacc 5760
 aggctagtcc ttgtctcatg gccatatttt gacctcagct ttccaaaagg caaggatgga 5820
 attacaggca tgaggggagc taaaggaatg tagagtcagt gattttggga gatttaattg 5880
 20 gaatagaacc atatttaggg ggaatctggg gaggttttaa ctatatataa tttaaaactt 5940
 ttctatttct ccattgggtg tgagaggatc agtctctcc ttccactgtg agatgctaag 6000
 gtcaaacctc tagcttgta ggcctggaca gcagtggctt ttattggctc tgccattttc 6060
 ccagacctat ttgcgggttt tctaagtcta atttgaatat gttgagaggc gtttgtgact 6120
 cctcccgag ataaggtatt tgtgaggact tggagacatt gccaggcct gaaggcttcg 6180
 25 gggtttctgg agattggaag ttattctgca gtctttaggg aactgggggc acttctgggg 6240
 cccctcaagc cgggctctgg agtggctggg tacttttcac ggctgggtgt ttccaggatg 6300
 gagcttcaag actttctcac gcaettcaac acagtgcaga tttgttctact gagtcttgag 6360
 gtgttggggc ccagccctgc tggcgcggc tggcatatcc acatcttcca gggccgctgg 6420
 30 gtgcgaggct tcaactccg tgggagtcag cccagcgtg gtgaggcctt ggggacccct 6480
 gagaagcaaa ctgggtgag gcttgtggca ggatgggaac tccacctcct tcttttctgt 6540
 cagaaaactt ctggaccaac cccagttcc ggctgacact gctggagcct gatgaggaag 6600
 aggatgacga tgatgaagag ggaccctggg gaggtctggg agcggcaggg gcccgggggc 6660
 cggcgagagg aggccgagtc cccaagtga cggctcctgt gtcaactcacc cagcgcaacc 6720
 35 gccggtgtct gagggccaag ggcctcactt acctcactgt gggcttccac gtgttccagg 6780
 tgaggccaag gtcaagttga ggtctggag gggcagaggg tcacaagggc accgttatgg 6840
 gcagaagtgt actgtgggtt caaagaggag tgccactgca gatattcatt gagaaaggga 6900
 ttcaggaaca ggaagagaaa aacgttgagg gtccgagagc aggaggggac caaaggggcca 6960
 gagaaggat gtgggcacag gtggaaggga aagggttggg ggaggggtca gagaggacct 7020
 40 aggtcaaaga tgaggaaata ttaagggttc agaaagagg aggggtgtga gaggtgtgga 7080
 aggggaggaa ggaaatctgc gagctctcca acctcattc ccttgggtgt ttcttctgc 7140
 agattccgga ggaggtgggt atcagatgcg gctccagaat taccctaggg ctgatggac 7200
 cagggcagga agcctgggaa cacgggaggg cctggccaga cagtctgggt gtgtgtggga 7260
 45 aatggcgcgg tggaggctat cagagggttg ggtggggagc tcgggtgggt ggtggtcatg 7320
 cccccctgcc cgcagctgct ggacctctgg gactccccgc gcagccgcgc gctcttgccg 7380
 ggactgctgc ggcgcgaccg ctcggttttc tgcgccgcgc gcgacgtgag ccgtcgctgt 7440
 cgcctgccgc ctggccacta cctgggtggt cccagcgct cgcgcgtagg cgatgaagcc 7500
 gacttcactc tgcgcattct ctcgagcgc agccacaccg cagtgtgagc cagtgtacc 7560
 50 tccataagcc ttaccagggg catcccagc ccggcccagg aacctcaatc tagaatcata 7620
 ggccccgccc ctggcaccaa gccccgcca ggaatcacia atccctgtcc ctgcatcttc 7680
 agccctgcc taccagggga ttccttctc cccaaaacc acactgcctt tgactataatc 7740
 cacttctct gctgagacct ccgccgaac gcttccctt tttctgtaac ttgcaggag 7800
 atcgatgacg tgatcagcgc agacctggac gccctccagg tgaggactgt tgtaggtggg 7860
 55 gacaagactc tagaggcggt gcagggtctt gggaaggaa tgaactcctc ctccccacag 7920
 gccccctaca agccccgga gctggagttg gcacagctat ttttggagct ggctggagag 7980
 gtaagagtgc gggactgggg atgccagcc aaatgacaac gagtccctc ctctccttag 8040
 atgtcttata aaacaaaaca aacctaaac caaatcaaac actgtagatc aggatatcca 8100
 60 ggaacagcta tgtattctgt agcccagact ggctccttc gggttacca tgcgtgggtt 8160
 aaacctgagt cactttgctg ggggttgggg tatctttct ttattctggg aatgetcaaa 8220
 ttgtctcaag gcctttgctg ggtctgcacc tcttctctc gaaggttccc atccccgcc 8280
 agactcaaaa catctttccc aagtgccttc ctctgtcact tgcccacggg gggccccac 8340
 agtgtgtctc ccaccactgt cctgaccact ctgaggacag gcctgcctcc tctagctgga 8400
 65 ccctaggaag gcagccacag ccatgccgtc agtcctatgg agcacagggc ctggcccaga 8460
 gtggattgtt ggctggatgt tttgaagtgg gttctttct gattaggagg aggaactcaa 8520
 cgtcttcag ctgcagacct taataagcat tgcctggaa cctggtgagt ttggctggag 8580
 gttgaggtg ggtccttgc aactgaagca ccatagctat acaggctcta tgtgtgatga 8640

agctagggcg	ccaggcacag	gaacaggact	tcctacaagg	ttatgtgagg	gccatgatca	8700
ctcgeagcca	cgccccactt	cctctaagag	gtgggggcag	aaatgtagaa	ccccagcttg	8760
gttggttctt	caggcatgaa	ctctcagcac	ctgcttctat	gatatgcca	ctgcagggag	8820
ttagtctgca	gtgctcttgc	agtgttgccc	tacatgcaag	gggtgctgga	tttttttgca	8880
gcgagggcca	acaccaggac	ccctggagag	attgggctta	ggacctgcga	acagcttggtg	8940
cagtgttttg	gggtacgtgg	ggtagtatat	ggagaggagg	gacagggatg	ctgggctttt	9000
ccttgccctt	taggggacat	tgattgtaac	cagggtgcct	cacttgcagc	gtgggcaaag	9060
actgtcccta	caccacttcc	aggagctctg	gggccatctc	atgtcatggc	aggtaggtga	9120
gggttgagag	cagctgcctc	cttctagaca	ctgatattgt	gtggatggac	aaagggggca	9180
ctgccaacga	ggatataaag	tcctgtcac	cccatagtgg	ccctctgagg	gcaccaaagt	9240
tagtgatcta	gagctgcctc	tggttcctgt	tggaattcca	ggteccagct	cagcttcttc	9300
cttgccaggt	gaccaaccac	aggcctgtca	cctccccttc	gaggagcctc	tgcttagcta	9360
ctaattgggt	ctccttcaag	gggaggagct	caagggtccc	agaactgatc	atagtataa	9420
ctccctgcta	ctgactcttc	cctaaccctc	gtgggtagat	ggatttgaac	ttgtcccca	9480
cagcctggga	gcttgctctc	ttctcacagg	tgtagagtgg	tgccccacca	gaagccacca	9540
gagctgaggc	cgtctcttag	ctacttcaag	gtgcaagagc	atcactctgg	ggctggactt	9600
gtgatactga	ctcccacctg	cctctccacc	ttccaggcca	catttgacaa	gtttgatgaa	9660
gatgcctctg	ggacaatgaa	ctcctgtgaa	ctgaggctgg	cactgactgc	tgagggtgtg	9720
gctgaggacc	tgggatgctg	tagggacagc	aaccatcct	caaattcttg	tctgcatccc	9780
tcagctgtgg	ccatccctaa	taggctgtcc	acaagtgcc	gagccattt	ccttccctgg	9840
aggctctgac	tgcttatctg	tgccatggct	aatgtgtagt	atggcaagga	gcccacaaga	9900
tgccacagaa	cacccagat	accctaaagc	accttatgag	gctacggagt	tatacaacag	9960
aggatgaaaa	tcccatccta	agccatggag	aaatgtatgt	tagggtggga	ttatcgtgat	10020
ttcagaagac	cgtcagctcc	atgcctccat	gggttcctct	gtgaccacta	agtaggagcc	10080
ggggcaggga	ggcagggggc	ggcacgtagg	ctagttagaa	atgagagact	acaagtatga	10140
gacctagaat	agtggccaag	aacatggaag	acaagatccc	aaggcagagt	ccaagggtgg	10200
ggccaggggtg	ctgaactaaa	gcagtggaca	caggacagag	gggaggtcgg	gaacttactc	10260
gatcatccat	ccattcatcc	cagagtgcct	ggttgttttg	gataggagtc	tgataataat	10320
gtttgcctgg	gaatcttcag	caattctaag	aggttgacag	agggtcctctg	ggtcaggaac	10380
tactgccatc	tagccaggtt	tcccttcagc	cctgggccag	catagacca	tactcaggg	10440
acatggacat	cagagggaca	ccgacctgcc	tcaggccacc	tagctctggg	catggtgtgc	10500
ctggtgttcg	tgggggtggg	aggggcagca	tctgttgaat	gagcacacaa	aggtacaata	10560
caaacttgta	cagttatctt	tgagactgta	tggggctcat	ggaagctggg	agggacaagt	10620
ccttgggect	tagggcttct	agaaatccat	tgcatgtgta	ttctacagca	gatgtgacag	10680
agccaatgtc	ttagctttag	gtgcggcctc	agaggaagag	tcacacagtg	gtacccagtc	10740
ggggagatag	tcggtcaacc	tctgaaggcg	caatcacaaa	gctgcacctg	ttggcacctt	10800
gagaagcagc	ctaagcaact	taagtgtcac	actaacttcc	cagagggctg	gggttgtagc	10860
tcaacggaga	gagcatttgc	ttggcctatg	caagggcccc	gggttccac	ccccaacact	10920
ccaaaacagc	cacaaaaggc	ccacatcagt	tggagagtgc	tcctcaagcg	tgctggaggc	10980
cctgagttct	agatcgagta	ccacataaac	cacaggctga	actcttgga	cccaggagg	11040
ggcaggggccc	tcaggagctg	gtgacagtcc	ttggctatgt	aggagttaga	ggacagcttc	11100
tttcaaacag	cacacaggaa	tgctgcgtag	gtaaggaaact	tttacttgca	actccagtgt	11160
gagggccaga	gttcagatcc	ccagcaccca	cgtgaagggc	aagtgatctc	ggtgagcctc	11220
ggcctcagta	gagaaaggac	tgaggaagac	gctccccatg	tacgtgtgcc	cacccccaac	11280
actaaaataa	gcagcaccac	acgtggatac	tgtaaacaca	ataaacaagg	cggcctcctc	11340
gtaggcttcc	acctcaacaa	ccagctgacc	cagtcctca	ctagccgcta	ccgggacagc	11400
cggtcccggtg	tggacttcga	gcgcttcgtg	ggetgtgcag	cccggctcac	ctgcatcttc	11460
cgtgagtact	cctggcaggc	agggtagggt	gtggtgggg	gtgcatcagg	gctggtgtg	11520
cgtactcacc	ctggcctctc	ccacacaggc	cactgtgcc	aacacctgga	tggcggcgag	11580
ggggtcgtct	gcctgaccca	caaacaggtg	agctggcccg	agggacagtg	tggctctagc	11640
accatccag	ggcctctgcc	tcaagggtat	ctttcttttc	tcttcagtg	tggaggtgg	11700
ctaccttctc	ataggtttga	agctgaggga	ggtcaccctg	ctgcccagct	cactgtcaca	11760
aaggtggtgg	ctatgtaacc	ctggccggcc	tcacaagtgc	tgggattacg	agctggagcc	11820
atcccaaaca	gaactgccac	ccttcctttt	gaagcctctt	catgtcagtc	cctgcttaga	11880
gaggggcaca	acccccacac	aggcactggg	ctggtgggca	ctgccagctc	cttggggcat	11940
gaacagagat	gcagggagaa	gatgacacca	gagtccttct	taaaaaatatt	acatgtttta	12000
ttctcccatc	cccagaggg	ggtttatcca	gaaaccaaga	aaataaaaaat	caatcagaat	12060
aaactcaagg	gggcgagtgg	agagaaaccc	attaacgacc	aggcaggcag	gccagcagcc	12120
tgctccacc	tcagaaggtc	cccagagacc	tctgccacc	gccacgagg	gaaaatcagg	12180
agggactggg	gagggcattg	aatcagctat	gtcttcatta	tgagagtgg	agaggtggca	12240
gagatatgca	gctagatgga	tatatattta	tataataaat	ccgtaagtta	ataaagtaaa	12300
tagtaattct	ctggaaggtc	ttaagttttt	aaagttttct	tttttttttt	aagttttttt	12360
tttccctttt	ttttttttaa	atgatttttt	tgtttgtttc	tgttccattc	tttgtgtttt	12420

gttggttttg gtccttagaa aatctgagac tcagaggcca ggtgggctgg ggctgattgc 12480
 cccgcagcca ctctgagggc agagaagggc tatggcaggt cctctgctcc tgggaggagc 12540
 cactggaatc tggccaggg gagctgggtg ccctctgctg gacttcttag ggcaggcggg 12600
 5 tcttggaaca ggcacatggg gctttggcct agatgtgaga ggctttgaag gggcctcagg 12660
 ggcagagggg acctgggata ggaaggatc tctggggcac aggagtcctg tgtccctcc 12720
 aatcggttaa gaaccacag cacagcgtat atatttagca gaccagaaat gctgattgcc 12780
 aagcctccct cccctacaag actgagaaag agaggcctgc ctagcccctc cctgcctgac 12840
 cccctagaag gaccacaaag agctctttgc atagatacag agtcagggtg ggggcagggc 12900
 10 tctcagccc ctccgggagg ccaagggagt ctctgttcag ggtggccaag ggcctcacag 12960
 gtcgtctcc ccataagagg ctgtggagaa ggactttag tcaagggcgc caggagcagc 13020
 atcaggcccc tggtaggggt ccatgcgggc gatgcagtac tcggcctggt cggggggcag 13080
 ctctctccgc agttcctcaa cagtgatgaa gttcta 13116

15

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

20 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Capn12-Primer

25

<400> 9

gaatggcgag tggcaacagg aag

23

30

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

35

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Capn12-Primer

40

<400> 10

tggggctcag cacaaaactc at

22

45

<210> 11

<211> 17

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

50

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Capn12-Primer

55

<400> 11

ttcaagactt tctcacg

17

60

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

65

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Capn12-Primer

<400> 12

tcgccccctt gagtttattc tga

23

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

5

<220>

10

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Hprt-Primer

<400> 13

atgccgaccc gcagtcccag cg

22

15

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

20

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Hprt-Primer

25

<400> 14

ggctttgtat ttggcttttc c

21

30

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

35

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Capn12-Primer

<400> 15

gggagggcca ggacaaggac t

21

40

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

45

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Capn12-Primer

50

<400> 16

agggaaggct ggaacaatgg agaa

24

55

<210> 17

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

60

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Capn12-Primer

65

<400> 17

gaatggcgag tggcaacagg aag

23

5 <210> 18
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

10 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 Capn12-Primer

15 <400> 18
 ctgggggtca gcacaaaact cat

23

20 <210> 19
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

25 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Capn5-Primer

<400> 19
 cggtgacact ggactgggcc ttgc

24

30 <210> 20
 <211> 23
 <212> DNA
 35 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Capn5-Primer

40 <400> 20
 aagccgcctg cagagcactg tgg

23

45 <210> 21
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

50 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Capn5-Primer

<400> 21
 cgaggagtga acggggccct g

21

55 <210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 60 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Capn5-Primer

65 <400> 22
 ctcactttct gccattcctc

20

1. Calpain-Protease 12 (Capn12), **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eine Aminosäuresequenz, umfassend die Aminosäuren 1–342 der SEQ ID NO: 1 aufweist, sowie deren funktionale Äquivalente.
2. Capn12 gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Aminosäuresequenz, ausgewählt unter SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 4 aufweist, sowie deren funktionale Äquivalente.
3. Capn12 gemäß einem der Ansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass sie Cystein-Protease-Aktivität aufweist.
4. Calpain-Protein, dadurch gekennzeichnet, dass es wenigstens eine Capn12 gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche aufweist.
5. Polynukleotid, das für eine Capn12 gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 kodiert, sowie deren funktionale Äquivalente und damit hybridisierbare oder dazu komplementäre Polynukleotide.
6. Polynukleotid gemäß Anspruch 5 mit einer Nukleinsäuresequenz, ausgewählt unter SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 oder SEQ ID NO: 8.
7. Expressionskassette, umfassend wenigstens eine regulatorische Nukleinsäuresequenz operativ verknüpft mit einem Polynukleotid gemäß einem der Ansprüche 5 und 6.
8. Rekombinanter Vektor, der ein Polynukleotid gemäß einem der Ansprüche 5 oder 6 oder eine Expressionskassette gemäß Anspruch 7 trägt.
9. Mikroorganismus, enthaltend wenigstens einen rekombinanten Vektor gemäß Anspruch 8.
10. Verfahren zur Herstellung einer Capn12 gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei man einen Mikroorganismus, welcher die Capn12 produziert, kultiviert und die Capn12 aus der Kultur isoliert.
11. Verwendung einer Capn12 gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 oder eines Calpain-Proteins gemäß Anspruch 4 als Cystein-Protease.
12. Pharmazeutisches Mittel, enthaltend eine Capn12 gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, ein Calpain-Protein gemäß Anspruch 4 oder einen rekombinanten Vektor gemäß Anspruch 8.
13. Verwendung einer Capn12 gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, eines Calpain-Proteins gemäß Anspruch 4 oder eines rekombinanten Vektors gemäß Anspruch 8 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krankheiten oder Krankheitszuständen, die im Zusammenhang mit einer unzureichenden Expression der Capn12 stehen.
14. Verwendung einer Capn12 gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 oder eines Calpain-Proteins gemäß Anspruch 4 zum Screening auf Calpain-Protease-Effektoren.
15. Immunglobulin mit Spezifität für eine Capn12 gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3.
16. Verwendung von Immunglobulinen gemäß Anspruch 15 oder Capn12-bindender Moleküle zur Diagnose von Krankheiten oder Krankheitszuständen, die im Zusammenhang mit einer Capn12-Expression stehen.
17. Verwendung von Polynukleotiden gemäß einem der Ansprüche 5 oder 6 zur Diagnose von Krankheiten oder Krankheitszuständen, die im Zusammenhang mit einer Capn12-Expression stehen.

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -



Fig. 1

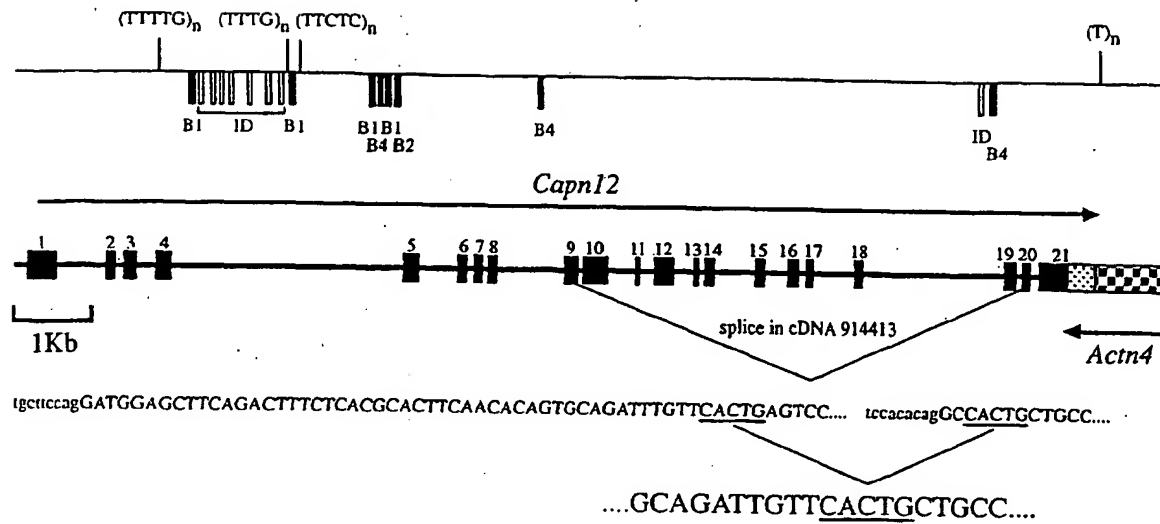


Fig. 2a

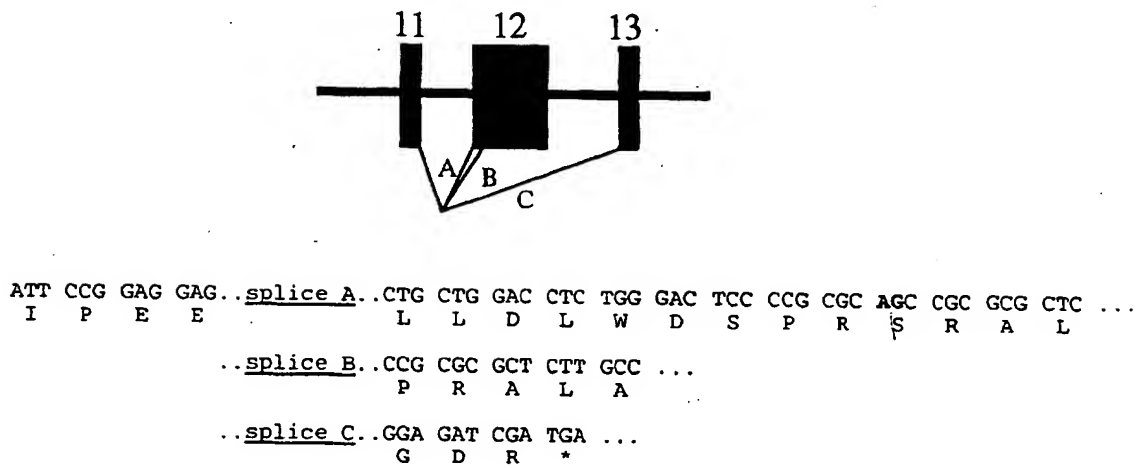


Fig. 2b

Exon-Intron Organisation des *Capn12* - Gens der Maus

Exon Nr.	Exon-Größe (bp)	Intron-Größe (bp)	Splice-Donor ^a	Splice-Akzeptor
1	305	590	G AGG CCG CATgtaaagtggg	taatctccagGAG TTT TGT G
2	70	149	GGA AGC TTG Ggtgagcccc	ctctctctagGA AAC TGC TG
3	119	234	C CAT TTT CAGgtagagttca	tcttcaaccagCtA TGG CAG T
4	134	2648	CC TAT GCC Aagtaaggactt	gctccaacagG CTC CAT GCC
5	169	474	T ACT GCC CTGgtgagagctg	ctctctccagAGT GAT CCG G
6	75	87	C ACG CAC AAGgtgagacgtt	ttgtcttcagATG TCT CTG G
7	86	79	GG AGT GAC AGgtaggatggg	gtctctccagC TGC CCA CCG
8	75	800	GC GAG TTC TCgtgagttctt	tgctttccagG ATG GAG CTT
9	164	83	CCC AGC GCT Ggtgagggcctt	ttttgttcagAA AAC TTC TG
10	236	363	C GTG TTC CAGgtgagggccaa	cttctctgcagATT CCG GAG G
11	12	181 ^b	T CCG GAG GAGgtgggtatcag	ctgcccgcagCTG CTG GA CC
		210 ^b	T CCG GAG GAGgtgggtatcag	cccccggcagCCG CCG GCT C
12A ^b	209	252	AC ACC GCA GTgtgagccagtg	taacttgcagG GAG ATC GAT
12B ^b	180			
13	43	81	C GCC CTC CAGgtgaggactg	ctccccacagGCC CCG TAC A
14	60	526	G GCT GGA GAGgtaaagagtog	tctctgattagGAG GAG GAA C
15	58	316	CTG GAA CCT Ggtgagtttgg	ttttttgcmgG AGG GCC AA
16	71	97	G TGT TTT GGGgtacgtgggg	tcacttgcagCGT GCG CAA A
17	63	524	G TCA TCG CAGgtaggtgagg	caccttccagGCC ACA TTT G
18	79	1629	ACT GCT GCA Ggtgtggctga	ctctctogtagCC TTC CAC CT
19	117	87	TGC ATC TTC Ggtgagtactc	tccccacacagCC CAC TGC TG
20	59	80	C CAC AAA CAGgtgaggtggc	ttctcttcagTGG TGG GAG G
21	624			

^a Intron- und Exonsequenzen sind in Klein- bzw. Großbuchstaben dargestellt. Exonsequenzen sind als Codon-Triplets dargestellt.

Die gleichbleibenden ersten und letzten Nukleotide der Introns sind fettgedruckt wiedergegeben.

^b Zwei alternative Splice-Akzeptor-Stellen am Beginn von Exon 12 werden verwendet (Details im Text).

Fig. 2c

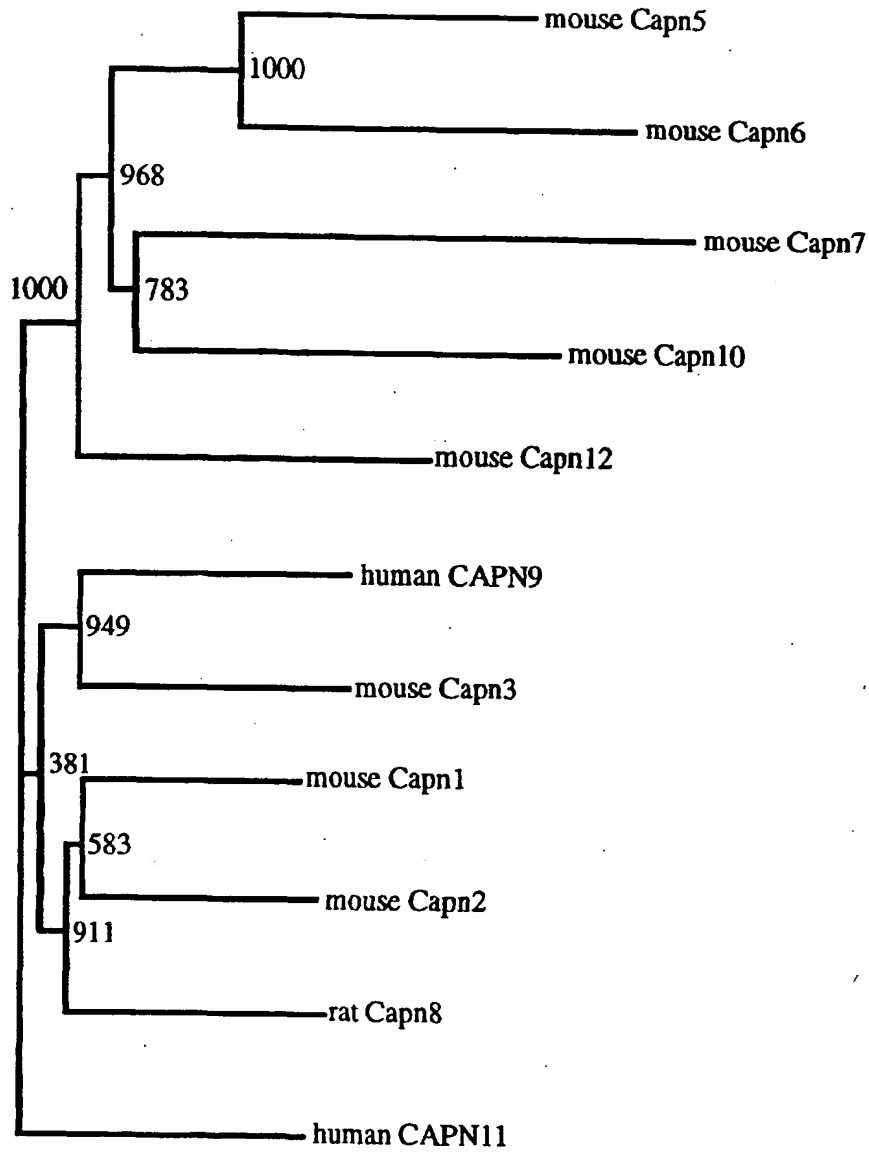


Fig. 3

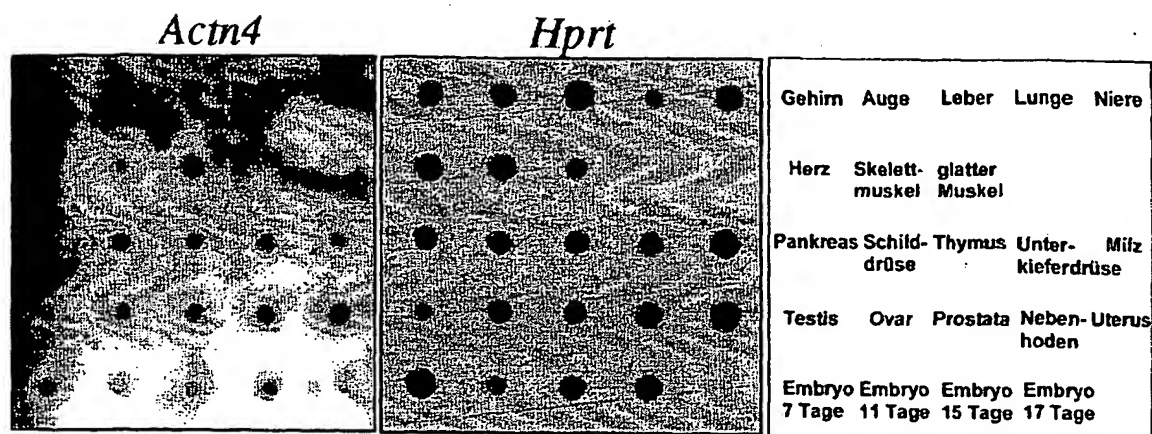


Fig. 4a

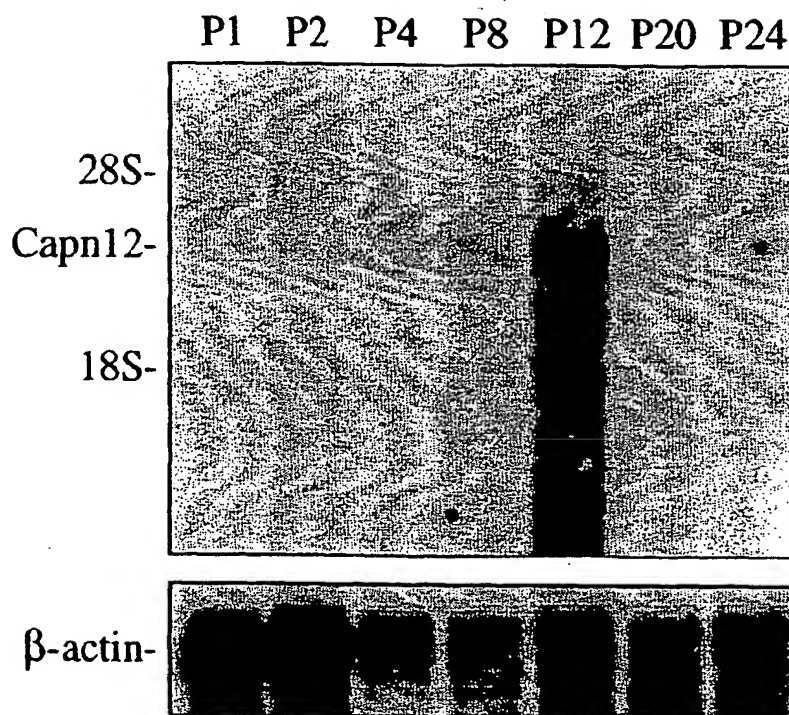


Fig. 4b

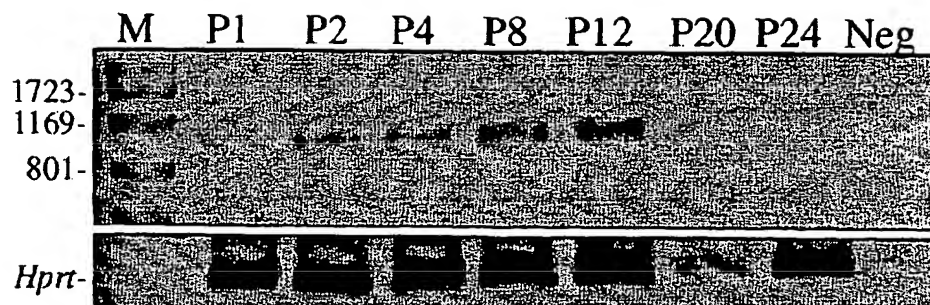


Fig. 4c

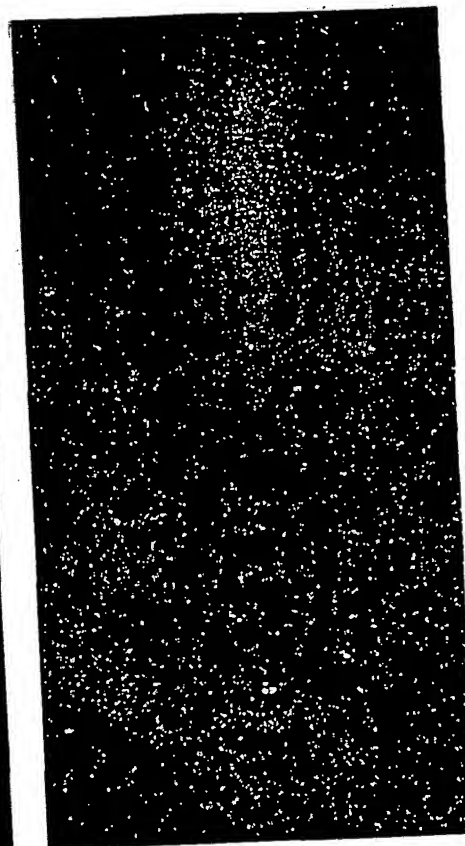
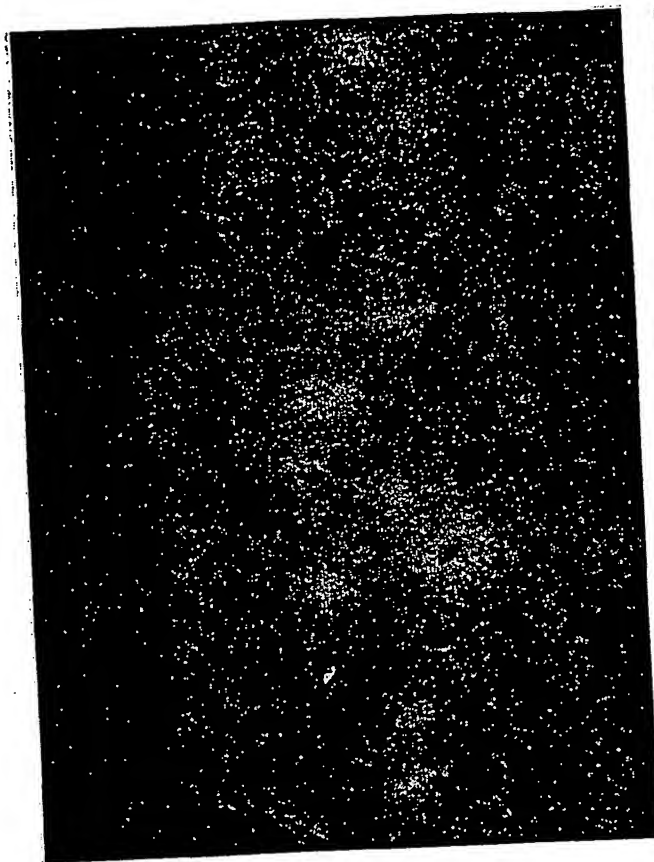


Fig. 5

